

Aus dem Veterinärmedizinischen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Heidrun Potschka

**Untersuchung erkrankungsmodifizierender und
antiepileptogener Effekte eines Blockers des Kaliumkanals
KCa3.1 in chronischen Epilepsiemodellen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Tanja Ongerth
aus Ludwigsburg

München 2014

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Tag der Promotion: 08. Februar 2014

Meiner Familie und Florian

I.	EINLEITUNG	1
II.	ÜBERSICHT	3
1.	Epilepsie	3
1.1.	Definition und Bedeutung	3
1.2.	Ursachen für Epilepsien	5
1.3.	Einfluss der Epilepsieerkrankung auf das Leben der Betroffenen	6
1.4.	Chronische Tiermodelle	7
1.4.1.	Amygdala-Kindling-Modell	8
1.4.2.	SE-BLA-Modell	10
2.	Mikroglia	10
2.1.	Einführung	10
2.2.	Mikrogliale Phänotypen und Mikrogliaaktivierung	11
3.	Anfallsinduzierte neuronale Plastizität	14
3.1.	Neurogenese	14
3.2.	Neurodegeneration	17
3.3.	Einfluss von Mikroglia	18
4.	Antiepileptogene und krankheitsmodifizierende Strategien.....	19
4.1.	Einführung	19
4.2.	Calciumabhängiger Kaliumkanal KCa3.1	20
4.3.	Triarylmethan-34.....	21
5.	Verhaltensuntersuchungen	23
5.1.	Einführung	23
5.2.	Verhaltensmodelle	24
5.2.1.	Open Field	24
5.2.2.	Black and White Box.....	24
5.2.3.	Elevated Plus Maze	25
5.2.4.	Morris Water Maze	25
III.	ZIELSETZUNG UND ARBEITSHYPOTHESEN.....	27
IV.	MATERIAL UND METHODEN	29
1.	Modulation der Mikrogliaaktivierung in chronischen Tiermodellen...29	
1.1.	Versuchstiere	29

1.2.	Elektrodenimplantation	30
1.3.	Anfallsparameter.....	32
1.4.	Triarylmethan-34.....	33
1.5.	Amygdala-Kindling-Modell	33
1.5.1.	Substanzversuche	35
1.5.2.	Massive Kindling.....	36
1.5.3.	Applikation von Phenobarbital	37
1.5.4.	Analytik	37
1.6.	Post-Status-Epilepticus-Modell	39
1.6.1.	Video- und EEG-Überwachung spontaner Anfälle.....	40
1.6.2.	Verhaltensmodelle	42
1.7.	Histologische Gewebeaufbereitung	45
1.8.	Histochemische und immunhistochemische Färbemethoden.....	47
1.8.1.	Nissl-Färbung	47
1.8.2.	Immunhistochemische Nachweismethoden.....	47
1.9.	Auswertung und Statistik	50
1.10.	Versuchsdesign	54
V.	ERGEBNISSE	57
1.	Amygdala-Kindling-Modell.....	57
1.1.	Beeinflussung der Anfallsparameter durch Modulation der Mikroglia- aktivierung im Amygdala-Kindling-Modell der Temporallappenepilepsie	57
1.2.	Einfluss der Vorbehandlung mit dem Blocker des Kaliumkanals KCa3.1 auf die Wirksamkeit des Standardepileptikums Phenobarbital	59
1.3.	Beeinflussung der zellulären Veränderungen im Bereich des Hippocampus durch TRAM-34 im Amygdala-Kindling-Modell	62
2.	Post-Status-Epilepticus-Modell	63
2.1.	Einfluss von TRAM-34 auf die Entstehung spontaner Anfälle im Post- Status-Epilepticus-Modell der Temporallappenepilepsie	64
2.2.	Prüfung des Effektes von TRAM-34 auf verhaltensassoziierte Veränderungen und kognitive Defizite	65
2.3.	Beeinflussung der zellulären Veränderungen im Bereich des Hippocampus durch TRAM-34 im Post-Status-Epilepticus-Modell	70
VI.	DISKUSSION	76

VII.	ZUSAMMENFASSUNG	88
VIII.	SUMMARY	91
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	94
X.	ANHANG	117
1.	Geräte	117
2.	Lösungen und Substanzen	120
3.	Beurteilung der Tiere nach dem modifizierten Irwin-Scale	125
XI.	DANKSAGUNG.....	128

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung	dv	dorso-ventral
ADD	afterdischarge duration (Nachentladungsdauer)	ED1	extracellular domain 1
ADT	afterdischarge threshold (Nachentladungsschwelle)	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
AE	Antiepileptikum	EEG	Elektroenzephalogramm
ANOVA	Varianzanalyse	EPM	Elevated Plus Maze
ap	anterior-posterior	etc.	et cetera
aqua dest.	Aqua destillata	Fa.	Firma
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	g	Gramm
BHS	Blut-Hirn-Schranke	GD	Gyrus dentatus
biot.	biotinyliert	h	Stunde
BLA	basolaterale Amygdala	HCl	Salzsäure
BrdU	Bromdesoxyuridin	HPLC	high performance liquid chromatography (Hochdruck-Flüssigkeits- chromatographie)
BSA	bovines Serumalbumin	HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
BWB	Black and White Box	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
bzw.	beziehungsweise	Hz	Hertz
C	Kohlenstoff	IFN	Interferon
Ca ²⁺	Kalzium	IGF	insulin-like growth factor
CA	Ammonshorn	IL	Interleukin
ca.	circa	ILAE	Internationale Liga gegen Epilepsie
CCD	charge-coupled device	iNOS	induzierbare Stickstoff- monoxid-Synthase
CCTV	closed circuit television	i.p.	intraperitoneal
cm	Zentimeter	K	Kalium
COX	Cyclooxygenase	Kap.	Kapitel
CRAC	Ca ²⁺ release activated Ca ²⁺ channel	KCa	calciumaktivierter Kaliumkanal
Cy	Carbocyanin	kg	Kilogramm
DAB	Diaminobenzidin	KGW	Körpergewicht
d.h.	das heißt		
DNS	Desoxyribonukleinsäure		

kS/s	Kilosamples pro Sekunde	pH	potentia hydrogenii
l	Liter		(Wasserstoffionen-
lat	lateral		konzentration)
LPS	Lipopolysaccharid	rER	raues endoplasmatisches
LRZ	Leibniz-Rechenzentrum		Retikulum
lx	Lux	rpm	rounds per minute
M	molare Masse	s	Sekunde
M1	proinflammatorische	s.c.	subkutan
	Makrophage	SD	seizure duration
M2	antiinflammatorische		(Anfallsdauer)
	Makrophage	SE	Status epilepticus
MK	Massive Kindling	SEM	standard error of the
MEZ	Mitteleuropäische Zeit		mean (Standardfehler)
mg	Milligramm	SGZ	subgranuläre Zone
MHC	major histocompatibility	SS	seizure severity
	complex		(Anfallsschwere)
min	Minute	SSC	Saline-Natriumcitrat
ml	Milliliter	SSSE	selbst-erhaltender
mm	Millimeter		Status epilepticus
ms	Millisekunde	SUDEP	sudden unexpected death
MWM	Morris Water Maze	SVZ	subventrikuläre Zone
n	Tierzahl, Gruppengröße	TBS	Tris-gepufferte
NaCl	Natriumchlorid		Natriumchloridlösung
NADPH	Nicotinamidadenin-	TGF	tumor growth factor
	dinukleotidphosphat	TLE	Temporallappenepilepsie
NaOH	Natronlauge	TNF	Tumornekrosefaktor
NeuN	neuronenspezifisches	TRAM-34	Triarylmethan-34
	Kernprotein	UV	ultraviolett
NGF	nerve growth factor	verd.	verdünnt
NO	Stickstoffmonoxid	µA	Mikroampère
OF	Open Field	µl	Mikroliter
p	Signifikanzniveau	µm	Mikrometer
PB	Phenobarbital	VZ	Vorbehandlungszeit
PFA	Paraformaldehyd	z.B.	zum Beispiel

z.T.

zum Teil

ZNS

zentrales Nervensystem

I. EINLEITUNG

Epilepsien zählen zu den häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) bei Hund, Katze und Mensch. Die Prävalenz liegt bei Hund und Katze bei circa 0,5-5%. In der Humanmedizin beträgt sie etwa 1-2%. Das bedeutet, dass in Deutschland nahezu 810.000 und weltweit sogar annähernd 50 Millionen Menschen von Epilepsie betroffen sind.

Der Krankheitskomplex ist durch spontan auftretende, wiederkehrende, epileptische Anfälle gekennzeichnet, welchen ein zentraler Ursprung zugrunde liegt. Als Ursachen kommen verschiedene Faktoren in Frage, wie zum Beispiel ein Schädel-Hirn-Trauma, Entzündungen, Tumore oder Sauerstoffmangel während der Geburt. Jeder dieser Insulte kann eine Funktionsstörung des Gehirns hervorrufen. Durch den initialen Insult kommt es zur Übererregbarkeit des neuronalen Netzwerkes. Dieser Prozess stellt einen wesentlichen Bestandteil der Epileptogenese dar und führt letztendlich zur Epilepsie. Hierbei kommt es zu unterschiedlichen neuropathologischen Veränderungen. Besonders auffällig sind der Verlust von Nervenzellen (Neurodegeneration), wie auch eine gestörte Neubildung von Neuronen (Neurogenese). Momentan existieren lediglich zwei bedeutende Therapiemöglichkeiten. Die chirurgische Resektion der Epilepsie verursachenden Hirnregion stellt eine wichtige therapeutische Maßnahme dar. Eine weitere Möglichkeit bietet die meist lebenslange Pharmakotherapie. Die Applikation von Antiepileptika (AEs) resultiert jedoch häufig in nicht zufriedenstellenden Therapieerfolgen. Dies gilt sowohl für die Human- als auch für die Veterinärmedizin. Circa ein Drittel der Patienten spricht nicht auf die Therapie an und gilt somit als pharmakoresistent. Aufgrund dieser schlechten Resistenzlage müssen in der Veterinärmedizin viele Patienten euthanasiert werden. Des Weiteren schränkt die Krankheit die betroffenen Humanpatienten bezüglich ihrer Lebensqualität sehr stark ein, da die Anfälle unkontrolliert auftreten. Zusätzlich kommt es häufig zu epilepsieassoziierten kognitiven Defiziten und psychiatrischen Erkrankungen, die die Lebensqualität weiter reduzieren.

Aus diesen Gründen wären Strategien zur Verhinderung der Epileptogenese sehr erstrebenswert. In diesem Zusammenhang soll im Folgenden das krankheitsmodifizierende sowie therapeutische Potenzial von Triarylmethan-34 (TRAM-34) untersucht werden. Es handelt sich hierbei um einen selektiven Blocker des calciumabhängigen Kaliumkanals KCa3.1, welcher im ZNS spezifisch in

Mikrogliazellen exprimiert wird. Die Blockade des Kanals soll die Aktivierung der Mikroglia insofern modulieren, dass ihre neuroprotektive Wirkung im Rahmen der Phagozytose erhalten bleibt, ihre neurodegenerative Wirkung, die durch das Ausschütten von neurotoxischen Substanzen zustande kommt, jedoch ausbleibt. Im besten Fall soll hierdurch die Epileptogenese verhindert werden, zumindest jedoch soll der Schweregrad der entstehenden Epilepsieerkrankung reduziert werden. Bei schon bestehenden Epilepsien soll durch TRAM-34 ein erkrankungsmodifizierender Effekt erzielt werden.

II. ÜBERSICHT

1. Epilepsie

1.1. Definition und Bedeutung

Der Begriff Epilepsie stammt ursprünglich aus dem Altgriechischen und bedeutet „plötzlich ergriffen“. Die Klassifikations- und Terminologiekommission der Internationalen Liga gegen Epilepsie (engl.: International League Against Epilepsy; ILAE) definiert Epilepsie als eine Funktionsstörung des Gehirns, die durch eine anhaltende Prädisposition gekennzeichnet ist, epileptische Anfälle zu entwickeln (FISHER et al. 2005). Weiterhin ist diese Erkrankung durch neurobiologische, kognitive, psychologische und soziale Folgen charakterisiert. Um von Epilepsie sprechen zu können, muss zudem mindestens ein epileptischer Anfall aufgetreten sein (FISHER et al. 2005). Dies bedeutet jedoch nicht, dass umgekehrt bei einmaligem Auftreten eines Anfalls bereits von Epilepsie gesprochen werden kann. Vielmehr kann dieser einen Hinweis auf die Prädisposition eines Patienten darstellen, Epilepsie zu entwickeln. Weiterhin muss eine anhaltende Veränderung des Gehirns vorliegen, die die Wahrscheinlichkeit des Auftretens zukünftiger Anfälle erhöht. Dies ist ein zentraler Punkt in der Definition der Epilepsie (FISHER et al. 2005). Zum Zeitpunkt der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit existiert zudem ein im Jahre 2013 erstellter Entwurf der ILAE mit Vorschlägen zur klinischen Definition der Epilepsie. Diese Arbeit bezieht sich aufgrund der noch ausstehenden Endfassung jedoch auf die seit dem Jahre 2005 geltende Fassung.

Ein epileptischer Anfall wird von der ILAE als das vorübergehende Auftreten von Zeichen und/oder Symptomen, die durch abnormale, übersteigerte oder synchrone neuronale Aktivität im Gehirn zustande kommen, definiert (FISHER et al. 2005). Diese abnormalen neuronalen Exzitationen manifestieren sich klinisch als Anfälle (KWAN u. BRODIE 2006). Epileptische Anfälle können eingeteilt werden in fokale und generalisierte Anfälle. Als fokaler Anfall bezeichnet man einen Anfall, der in einem auf eine Großhirnhemisphäre beschränkten Netzwerk auftritt und dabei entweder eng umschrieben oder dezentralisiert sein kann (BERG et al. 2010). Ein fokaler Anfall erfolgt entweder mit oder ohne Beeinträchtigung des Bewusstseins und kann sekundär generalisieren. Der generalisierte Anfall ist definiert als ein Anfall, der in einem bilateral verteilten Netzwerk auftritt und sich dort schnell ausbreitet. Er kann entweder tonisch-klonisch (in jeder Kombination), als Absence (typisch, atypisch, mit

speziellen Merkmalen), myoklonisch, klonisch, tonisch oder atonisch sein (BERG et al. 2010). Eine Sonderform des epileptischen Anfalls stellt der *Status epilepticus* (SE) dar. Er ist durch eine 30 Minuten lange Anfallsaktivität oder durch Cluster-Anfälle in einem Zeitraum über 30 Minuten gekennzeichnet, zwischen denen die Patienten das Bewusstsein gar nicht oder nur teilweise wiedererlangen (DUPONT 2009). Die Diagnose liefert eine klinische Untersuchung oder die Analyse des Elektroenzephalogramms (EEG). Beim Auftreten eines tonisch-klonischen SE findet aufgrund seines besonderen Schweregrades eine andere Definition Anwendung. Da in diesem Fall ein frühes therapeutisches Eingreifen lebensrettend sein kann, gilt bereits eine länger als fünf Minuten andauernde generalisierte, konvulsive Anfallsaktivität oder ein mindestens zweimalig auftretender generalisierter Anfall ohne zwischenzeitliche Wiedererlangung des Bewusstseins als SE (DUPONT 2009). Die Mortalitätsrate liegt beim SE zwischen 7,6 bis 39%. Demnach stellt ein SE immer ein potentiell lebensgefährliches Ereignis dar und bedarf schnellstmöglicher notärztlicher Betreuung.

Als eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen besitzt die Epilepsie sowohl in der Veterinär- als auch der Humanmedizin eine sehr große Bedeutung (CHANG u. LOWENSTEIN 2003). Die Prävalenz liegt beim Hund bei 0,5-5% (PODELL et al. 1995). Einige Hunderassen besitzen eine Prädisposition für das Auftreten der Epilepsieerkrankung, sodass ein genetischer Einfluss angenommen wird. Das Geschlecht des Tieres scheint hierbei keinen Einfluss auf die Entwicklung einer Epilepsie zu haben (ZIMMERMANN et al. 2009b). Auch bei Katzen treten epileptische Anfälle auf. Dies ist jedoch seltener zu beobachten (SMITH BAILEY u. DEWEY 2009).

In der Humanmedizin ist schätzungsweise 1% der Menschen in den industrialisierten Ländern von Epilepsie betroffen (MARTINOVE 2010). In Entwicklungsländern sind die Zahlen sogar noch höher (CARPIO u. HAUSER 2009). Schätzungsweise leiden demnach weltweit ca. 50 Millionen Menschen an Epilepsie (HENSHALL u. SIMON 2005). Für die Behandlung steht eine Vielzahl an AEs zur Verfügung. Allerdings ist etwa ein Drittel der Epilepsiepatienten gegenüber den gängigsten Wirkstoffen resistent. Daher können die epileptischen Anfälle bei diesen Patienten nicht medikamentös unter Kontrolle gebracht werden (KWAN u. BRODIE 2000). In der Tiermedizin wird insbesondere Phenobarbital als AE eingesetzt. Zusätzlich kann Kaliumbromid verabreicht werden, wenn Phenobarbital alleine zur Anfallskontrolle

nicht ausreicht (KLUGER et al. 2009). Mittlerweile finden in der Tiermedizin zudem neuere Medikamente wie Zonisamid und Levetiracetam vermehrt Anwendung, da sie den Vorteil geringerer Nebenwirkungen besitzen (THOMAS 2010). Des Weiteren existiert in der Humanmedizin die Möglichkeit einer chirurgischen Resektion der die Anfälle verursachenden Hirnareale, wodurch in einigen Fällen eine Anfallsfreiheit erreicht werden kann (GILLIAM u. ALBERTSON 2011). Der epileptische Fokus muss hierfür individuell bestimmt werden und zudem chirurgisch gut erreichbar sein (FOLDVARY et al. 2001). Eine Anfallsfreiheit gelingt jedoch häufig nur in Kombination mit einer lebenslangen, zusätzlichen Pharmakotherapie (LOSCHER u. SCHMIDT 2002). In der Veterinärmedizin ist die chirurgische Resektion dieser Areale noch nicht möglich.

1.2. Ursachen für Epilepsien

Epileptischen Anfällen können viele verschiedene Ursachen zugrunde liegen. Epilepsien entstehen durch das Zusammenwirken einer angeborenen erhöhten Anfallsbereitschaft und einer Schädigung des Hirngewebes. Die erhöhte Anfallsbereitschaft kann dabei vererbt werden (BERG et al. 2010). Die Schädigung des Hirngewebes erfolgt entweder im Rahmen der Geburt, durch entzündliche Prozesse im Gehirn, angeborene Stoffwechselstörungen, Traumata durch Unfälle, Hirnblutungen oder Tumore. Epilepsieerkrankungen werden aufgrund ihrer Ätiologie in drei Gruppen eingeteilt: genetische Epilepsie, strukturelle und metabolische Epilepsie, sowie Epilepsie unbekannter Ursache (BERG et al. 2010).

Bei der genetischen Epilepsie werden die Anfälle durch einen oder mehrere bekannte oder vermutete genetische Defekte ausgelöst. Jedoch können auch externe Faktoren zur Entstehung der Erkrankung beitragen. Um welche Faktoren es sich genau handelt, ist hierbei noch nicht bekannt. Strukturelle und metabolische Epilepsieursachen werden zusammengefasst, da bei beiden primär eine andere Krankheit im Vordergrund steht, die jedoch das Risiko eine Epilepsie zu entwickeln deutlich erhöht (BERG et al. 2010). Zu den strukturellen Läsionen zählen natürlich erworbene Erkrankungen wie Traumata, Infektionen und Schlaganfälle. Sie können aber auch einen genetischen Ursprung besitzen, beispielsweise eine kortikale Fehlentwicklung. In diesem speziellen Fall handelt es sich um eine separate Erkrankung, die eine Mischung aus Gendefekt und Epilepsie darstellt. Kann die zugrunde liegende Ursache der Epilepsieerkrankung nicht aufgeklärt werden, spricht man von Epilepsie unbekannter Ursache (BERG et al. 2010).

1.3. Einfluss der Epilepsieerkrankung auf das Leben der Betroffenen

Die Epilepsieerkrankung ist für die Betroffenen meist mit Einschränkungen der Lebensqualität verbunden. Bei Veterinärpatienten handelt es sich hierbei häufig um unerwünschte Nebenwirkungen der AEs wie z.B. Ruhelosigkeit, Juckreiz, Lethargie, Ataxie, Durchfall und Erbrechen (CHANG et al. 2006). Therapieresistente Anfälle sowie das Auftreten eines SE können die Lebenserwartung reduzieren und erfordern in der Veterinärmedizin in einigen Fällen sogar eine Euthanasie (ZIMMERMANN et al. 2009a). Zudem stellen die unvorhersehbaren epileptischen Anfälle eine große Gefahr dar. Als häufigste Verletzungen bei humanen Epilepsiepatienten gelten Prellungen, offene Wunden, Knochenbrüche, Schürfwunden, Gehirnerschütterungen sowie Verbrennungen (TOMSON et al. 2004; BEGHI 2009). Stürze aus großer Höhe, Ertrinken, Verbrennen oder Unfälle im Straßenverkehr sind eine relativ häufige Todesursache bei Epilepsiepatienten (BAUMGARTNER 2001). Die im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung erhöhte Sterblichkeitsrate wird häufig zusätzlich durch die der Epilepsie zugrunde liegende Erkrankung bedingt. Oft sind dies Neoplasien oder zerebrovaskuläre Erkrankungen (TOMSON 2000). Die häufigste Todesursache bei Epilepsiepatienten stellt jedoch der plötzliche, unerwartete Tod (*sudden unexpected death*, SUDEP) dar (TOMSON et al. 2005; SURGES et al. 2009). Die Mechanismen, welche zum SUDEP führen, sind noch nicht vollständig geklärt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass anfallsassoziierte Atemnot, kardiale Arrhythmien und postiktale Kardiomyopathien für den SUDEP verantwortlich sein können (SURGES u. SANDER 2012). Patienten mit therapieresistenter Epilepsie besitzen im Vergleich zu anfallsfreien Patienten ein etwa 40fach erhöhtes Risiko an einem SUDEP zu sterben (LHATOO u. SANDER 2005). Die Anfälle beeinträchtigen darüber hinaus die geistige Gesundheit der Patienten. Suizid stellt mit einer Prävalenz von 10% in diesem Zusammenhang eine häufige Todesursache bei Epilepsiepatienten dar (KWON et al. 2011). Einen besonderen Stellenwert haben hierbei psychosoziale Aspekte. Die Diagnose Epilepsie sowie der ungewisse Verlauf der Erkrankung stellen für viele Epilepsiepatienten eine große Belastung dar (JACOBY 1992). Auch für Patientenbesitzer ist das Leben mit der Epilepsieerkrankung ihrer Tiere mit einer großen Belastung verbunden. Zusätzlich tragen epilepsieassoziierte Komorbiditäten wie Persönlichkeitsstörungen, Psychosen, Depression, sowie Angst- und Panikstörungen zur Verringerung der Lebensqualität bei (PAULI u. STEFAN 2009a). Kognitive Defizite, die häufig als Begleiterscheinung der Epilepsie auftreten, stellen

ein weiteres Problem für die Betroffenen dar (STEFAN u. PAULI 2008). Auch heute noch fühlen sich Epilepsiepatienten stigmatisiert und von der Gesellschaft ausgegrenzt (BAKER et al. 1997). Viele Epilepsiepatienten müssen ihren Beruf aufgeben und sind zum Teil stark in ihrer privaten Freizeitgestaltung eingeschränkt. Auch die Überprotektion mancher Angehöriger und der Verlust der Unabhängigkeit tragen zu einer erheblichen Einschränkung der Selbstständigkeit der Betroffenen bei (PAULI u. STEFAN 2009b). Hunde zeigen ebenso wie Menschen epilepsieassoziierte Verhaltensänderungen (SHIHAB et al. 2011). Hierbei lassen sich bei Hunden mit idiopathischer Epilepsie ein gesteigertes angstassoziiertes Verhalten, z.T. verbunden mit Angstaggression, sowie eine abnormale Wahrnehmung feststellen. Das Ausmaß der Verhaltensänderungen ist dabei bei pharmakoresistenten Hunden größer (SHIHAB et al. 2011).

1.4. Chronische Tiermodelle

Um neue Therapieansätze zu entwickeln und Epilepsie weiter zu erforschen, benötigt man geeignete Modellsysteme. Aus ethischen Gründen kann man diese Grundlagenforschung nicht in vollem Umfang an Humanpatienten durchführen. Ein Problem bei der Arbeit mit humanem Gewebe ist das fehlende Kontrollgewebe. Für die Erforschung von Epilepsie muss deshalb zusätzlich mit Tiermodellen gearbeitet werden.

Man unterscheidet hierbei zwei verschiedene Typen (Abb. 1). Die sogenannten „akuten“ Modelle oder auch Anfallsmodelle werden eingesetzt, um die Wirkung von Antikonvulsiva zu untersuchen. Hierfür werden an gesunden Tieren epileptische Anfälle induziert. Für die Untersuchung der Epileptogenese, also der Entwicklung des prokonvulsiven neuronalen Netzwerkes, werden „chronische“ Modelle verwendet. Hierzu zählen beispielsweise genetisch veränderte, epileptische Hunde mit spontanen Anfällen (LOSCHER 1997) und Tiere, deren epileptogener Prozess durch elektrische und chemische Einflüsse induziert wird [z.B. das Kindling-Modell und das SE-basolaterale Amygdala-Modell (SE-BLA-Modell) oder Pilocarpin und Kainsäure (GODDARD et al. 1969; BEN-ARI et al. 1981; HONCHAR et al. 1983; BRANDT et al. 2003)]. Bei den Tieren treten nach einer Latenzzeit spontane epileptische Anfälle auf. In diesen Modellen kommt es, ähnlich wie bei Epilepsiepatienten, bei denen die Krankheit durch einen initialen Insult (Enzephalitis, Tumor, Schädelhirntrauma) ausgelöst wird, zur Generierung eines epileptogenen Netzwerkes.

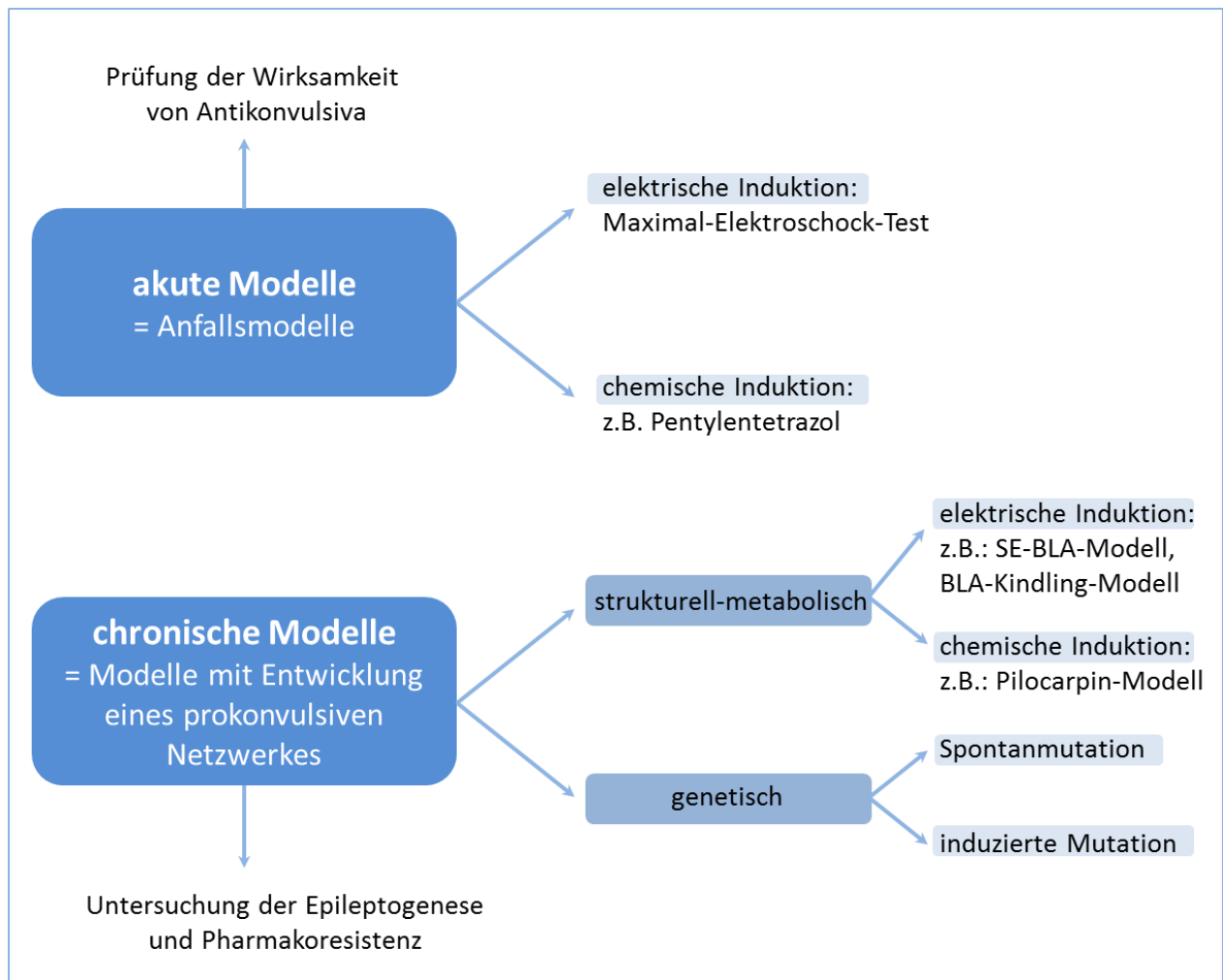


Abb. 1: Beispielhafte Übersicht über die in der Epilepsieforschung angewandten Tiermodelle.

SE = Status epilepticus, BLA = Basolaterale Amygdala

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation werden das elektrische Amygdala-Kindling-Modell sowie das SE-BLA-Modell angewendet, weshalb diese im Folgenden kurz erläutert werden sollen.

1.4.1. Amygdala-Kindling-Modell

Im Amygdala-Kindling-Modell werden die Anfälle elektrisch induziert. Ohne diesen Impuls entwickeln die Tiere keine Anfälle. Das Kindling-Modell wurde im Jahr 1969 von der Arbeitsgruppe des kanadischen Psychologen Graham Goddard an Ratten entwickelt (GODDARD 1969). Es stellt ein anerkanntes Modell der Temporallappenepilepsie (TLE) dar und repräsentiert dabei die fortschreitende Entwicklung generalisierter Anfälle, die durch wiederholte unterschwellige elektrische Stimuli verschiedener limbischer Strukturen hervorgerufen wird (LÖSCHER 1997). Die Folge ist die Entstehung eines permanenten epileptischen Netzwerkes in der

stimulierten Region (MCINTYRE et al. 2002). Die Amygdala zählt hierbei zu den sensibelsten Strukturen, in denen das elektrische Kindling ausgelöst werden kann (SITCOSKE O'SHEA et al. 2000). Der Begriff „Kindling“ stammt aus dem Englischen und bedeutet „entflammen“. Die bei diesem Modell wiederholt angewandten elektrischen Stimulationen führen zu Anfällen, die im weiteren Verlauf an Anfallsdauer und Anfallsschwere zunehmen (SATO et al. 1990). Der elektrische Impuls wird über eine unilaterale Stimulations- und Ableitelektrode im Bereich der BLA gesetzt (PINEL u. ROVNER 1978). Die tägliche Stimulation der Tiere für jeweils eine Sekunde bei gleich bleibender Stromstärke führt nach einiger Zeit zu zunächst fokalen Anfällen, die sich bei zunehmender Anzahl an Stimulationen zu sekundär generalisierten Anfällen entwickeln. Das Gehirn reagiert zunehmend empfindlicher auf den Stimulus. Ab einem bestimmten Zeitpunkt verändert sich jedoch dieser erhöhte Grad der Empfindlichkeit nicht weiter, die Tiere gelten nun als „vollgekindelt“ (MCNAMARA 1984). An vollgekindelten Tieren kann nun ermittelt werden, ob Wirkstoffkandidaten die Krampfschwelle verändern können. Der Kindling-Prozess spiegelt eine stark ausgedehnte Latenzzeit vom initialen Insult bis zur Entwicklung spontaner Anfälle wider (GODDARD 1969). Nach ausreichend häufiger Stimulation (ca. 200 Stimulationen) können somit auch bei gekindelten Tieren spontane epileptische Anfälle auftreten (PINEL u. ROVNER 1978). Für den Nachweis antikonvulsiver oder prokonvulsiver Wirkungseffekte, stellt das Kindling-Modell als Modell der chronischen TLE dank seiner hervorragenden prädiktiven Validität ein häufig verwendetes Modell dar (POTSCHKA et al. 2000; LOSCHER 2002; MCINTYRE u. GILBY 2009). Hierfür wird vollgekindelten Tieren die Testsubstanz verabreicht und anschließend geprüft, welche Stromstärke bei dem Tier einen Anfall auslöst. Die Stromstärke wird dabei schrittweise um jeweils 20% erhöht. Anschließend können die für die Auslösung eines Anfalls benötigten Stromstärken in An- und Abwesenheit der Testsubstanz verglichen werden. Hierdurch werden Substanzeffekte auf die chronische Phase der Epilepsie untersucht. Um deren Wirkung auf den Prozess der Epileptogenese zu überprüfen, kann die zu testende Substanz zum Beispiel während des „Aufkindelns“ appliziert werden. Als „Massive Kindling“ wird die mehrmals täglich wiederholte Stimulation bei definierter, gleichbleibender Stromstärke über einen bestimmten Zeitraum bezeichnet (z.B. fünfmal täglich im Abstand von einer Stunde über einen Zeitraum von neun Tagen) (PEKCEC et al. 2009).

1.4.2. SE-BLA-Modell

Die Stimulation der BLA über die implantierte Elektrode erfolgt in diesem Modell durch einen 25-minütigen elektrischen Stimulus der Stromstärke 700 μ A (BRANDT et al. 2003). Dadurch kommt es zu einem sich selbst-erhaltenden SE (SSSE), der anhand der Anfallsschwere in drei Typen eingeteilt werden kann. Als Typ 1 werden nicht-convulsive fokale Anfälle mit Stereotypien wie Schnüffeln gewertet. Typ 2 beschreibt die Tiere, die vorwiegend fokale Anfälle zeigen, bei denen jedoch auch einzelne generalisierte Anfälle auftreten. In Typ 3 werden Tiere eingeordnet, die vorwiegend generalisierte Anfälle haben (BRANDT et al. 2003). Der verwendete Rattenstamm, das Geschlecht sowie die Lokalisation der Elektrode beeinflussen die prozentuale Verteilung der Tiere innerhalb dieser drei Typen. Die Anzahl der Tiere, die infolge des SSSE spontane epileptische Anfälle entwickeln, ist vom Typ des SSSE abhängig. Nur circa 33% der Tiere, die Typ 1 zugeordnet wurden, entwickeln längerfristig epileptische Anfälle. Im Gegensatz dazu liegt der Prozentsatz bei Typ 2 und 3 bei 90%. Die Dauer des SSSE bestimmt zudem die anschließende Entwicklung der Epilepsie und Neuropathologie. Sie muss mindestens 4 Stunden betragen, um einen Temporallappenschaden zu verursachen, der nach einer Latenzzeit spontane Anfälle verursacht. In diesem Modell wird die Krampfaktivität nach vier Stunden mit Diazepam beendet. Bei Tieren mit Typ 1 SSSE treten neurodegenerative Prozesse nur regional auf, wohingegen sie bei Tieren mit Typ 2 oder 3 ausgeprägter sind.

2. Mikroglia

2.1. Einführung

Mikrogliazellen wurden im Jahre 1919 erstmals von Rio-Hortega beschrieben (REZAIE u. MALE 2002). Bei diesen Zellen handelt es sich um ansässige Makrophagen des ZNS (KIM u. DE VELLIS 2005). Sie machen etwa 5-10% der Zellpopulation im adulten Gehirn aus (TURRIN u. RIVEST 2006). Jahrelang wurde über den Ursprung dieser Zellen diskutiert. Neuere Studien deuten nun auf einen mesenchymalen Ursprung hin. Im Zuge der Entwicklung des Gehirns kommt es zur Einwanderung der Mikrogliazellen in selbiges (CHAN et al. 2007), welche in zwei Wellen erfolgt. Die erste Welle findet beim Menschen während der ersten zwei Drittel der fetalen Entwicklung statt, die zweite Welle folgt während der ersten Tage nach der Geburt (REZAIE et al. 2005). Die eingewanderten Zellen werden amöboide

Mikroglia genannt. Sie besitzen Eigenschaften von Monozyten und stammen wahrscheinlich von hämatopoetischen Stammzellen ab (VITRY et al. 2003; ASHEUER et al. 2004). Die Mikrogliazellen differenzieren schließlich zu ramifizierten Mikrogliazellen, früher ruhende Mikroglia genannt, aus. Diese sind charakterisiert durch ein kleines Soma mit stark verzweigten Fortsätzen (HANISCH u. KETTENMANN 2007). Am Ende der Entwicklung haben Mikrogliazellen alle Regionen des Gehirns bevölkert. Sie reagieren auf jeden pathologischen Stimulus mit einem Prozess, der Mikrogliaaktivierung genannt wird.

2.2. Mikrogliale Phänotypen und Mikrogliaaktivierung

Ramifizierte Mikrogliazellen wurden bis vor kurzem als untätig angesehen (KREUTZBERG 1996). Tatsächlich scannen diese Zellen jedoch aktiv ihre Umgebung. Ihre feinen Fortsätze befinden sich in ständiger Bewegung (DAVALOS et al. 2005; NIMMERJAHN et al. 2005). Mikroglia haben die Fähigkeit, durch verschiedene Rezeptoren ein breites Spektrum an Signalen zu erkennen, die eine Bedrohung für die strukturelle und funktionelle Integrität des ZNS darstellen (HANISCH u. KETTENMANN 2007). Das Auftreten von Infektionen, Traumata, Ischämie, neurodegenerativen Erkrankungen sowie Störungen oder Verlust der Homöostase im Gehirn führt zu einer Änderung des Phänotyps (BLOCK et al. 2007). Dieser Prozess wird auch Mikrogliaaktivierung genannt. Die zellulären Fortsätze ziehen sich zurück und die Mikroglia bekommt ein amöboides Aussehen. Hierdurch wird sie beweglich und kann nun anhand chemotaktischer Gradienten aktiv zum Ort der Läsion oder dem Infektionsherd wandern (KETTENMANN et al. 2011). Ob Mikrogliazellen hierbei eine heilsame oder eine schädliche Wirkung entfalten, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Hierzu zählen Art des Insultes, Dauer sowie Zeitpunkt der Schädigung, das Milieu, die Interaktion mit anderen Zelltypen und sogar das Alter des Organismus (WALTER u. NEUMANN 2009). Mikroglia lassen sich anhand ihres Phänotyps und ihrer Wirkung in mindestens zwei Untergruppen einteilen, wobei es zahlreiche weitere Zwischenstadien gibt (CZECH et al. 2011). Der durch einen bestimmten Stimulus aus der ramifizierten Mikroglia entstehende Phänotyp ist von der Art der Aktivierung abhängig. Man unterscheidet hierbei die klassisch aktivierte Mikroglia von der alternativ aktivierten Mikroglia (Abb. 2). Die klassische Aktivierung erfolgt durch Lipopolysaccharid (LPS) sowie das proinflammatorische Zytokin Interferon-gamma (IFN- γ) und führt zu proinflammatorischen Makrophagen (M1) (CZECH et al. 2011). Diese exprimieren

CD86 und CD16/32 und produzieren große Mengen an oxidativen Metaboliten (Stickstoffmonooxid (NO) und Superoxide) sowie Proteasen und proinflammatorische Zytokine. Somit spielen diese klassisch aktivierten Mikrogliazellen eine zentrale Rolle bei der Abwehr gegen Pathogene und Tumorzellen, können jedoch auch gesunde Zellen, wie Neuronen und Gliazellen schädigen (CZECH et al. 2011). Die alternative Aktivierung durch Interleukin (IL)-4 und IL-13 führt hingegen zur Entstehung antiinflammatorischer Makrophagen (M2), welche CD206 und Arginase 1 exprimieren (CZECH et al. 2011). Diese hemmen den Entzündungsprozess und fördern die Gewebeheilung und Angiogenese. Die Einteilung in die beiden Phänotypen mit ihrer unterschiedlichen Wirkung auf das Gewebe stellt eine starke Vereinfachung der Zustände dar. Tatsächlich existieren zahlreiche Zwischenformen (MOSSER u. EDWARDS 2008). Zudem bedeutet das Vorhandensein dieser beiden Aktivierungswege nicht, dass diese nur einzeln auftreten. Der Effekt auf das umliegende Gewebe hängt vielmehr vom Verhältnis von M1 zu M2 Mikrogliazellen ab (GORDON 2003; KIGERL et al. 2009). Selbst eine der wichtigsten Funktionen der Mikroglia, die Phagozytose, kann sowohl heilsamen (Pathogene, Hirntrauma) als auch schädlichen Einfluss (Autoimmunkrankheit) haben (CZECH et al. 2011). Die Änderung des Phänotyps ist jedoch nicht die einzige Folge der Mikrogliaaktivierung. Es kommt zudem zur Proliferation, Migration zum Ort des Schadens, sowie zur Sekretion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Faktoren wie NO, die oxidativen Stress verursachen (HANISCH u. KETTENMANN 2007; GRAEBER u. STREIT 2010).

Bezüglich der Zytokinproduktion im Gehirn nimmt die Mikroglia eine Doppelrolle ein. So können Mikrogliazellen sowohl auf vorhandene Zytokine reagieren, als auch selbst Zytokine produzieren. Diese können neuroprotektive (z.B. IL-10, *tumor growth factor* (TGF)- β , Tumornekrosefaktor (TNF)- α) sowie neurotoxische Wirkung (z.B. TNF- α , IL-1, IFN- γ) haben. Hierbei kann das klassischerweise proinflammatorische Zytokin TNF- α sowohl neurotoxisch als auch neuroprotektiv wirken (CZECH et al. 2011). Dies ist abhängig von der Konzentration im Gewebe (BRUCE et al. 1996).

Als wichtigste Immunzellen des ZNS, exprimieren Mikrogliazellen zudem konstitutiv kleine Mengen der wichtigsten Immunrezeptoren (*Major Histocompatibility Complex* (MHC) I und II, Chemokinrezeptoren) (WALTER u. NEUMANN 2009). Sie sind somit an der humoralen und zellulären Immunantwort des Körpers beteiligt. Während der Aktivierung werden immunologisch relevante Moleküle hochreguliert und das

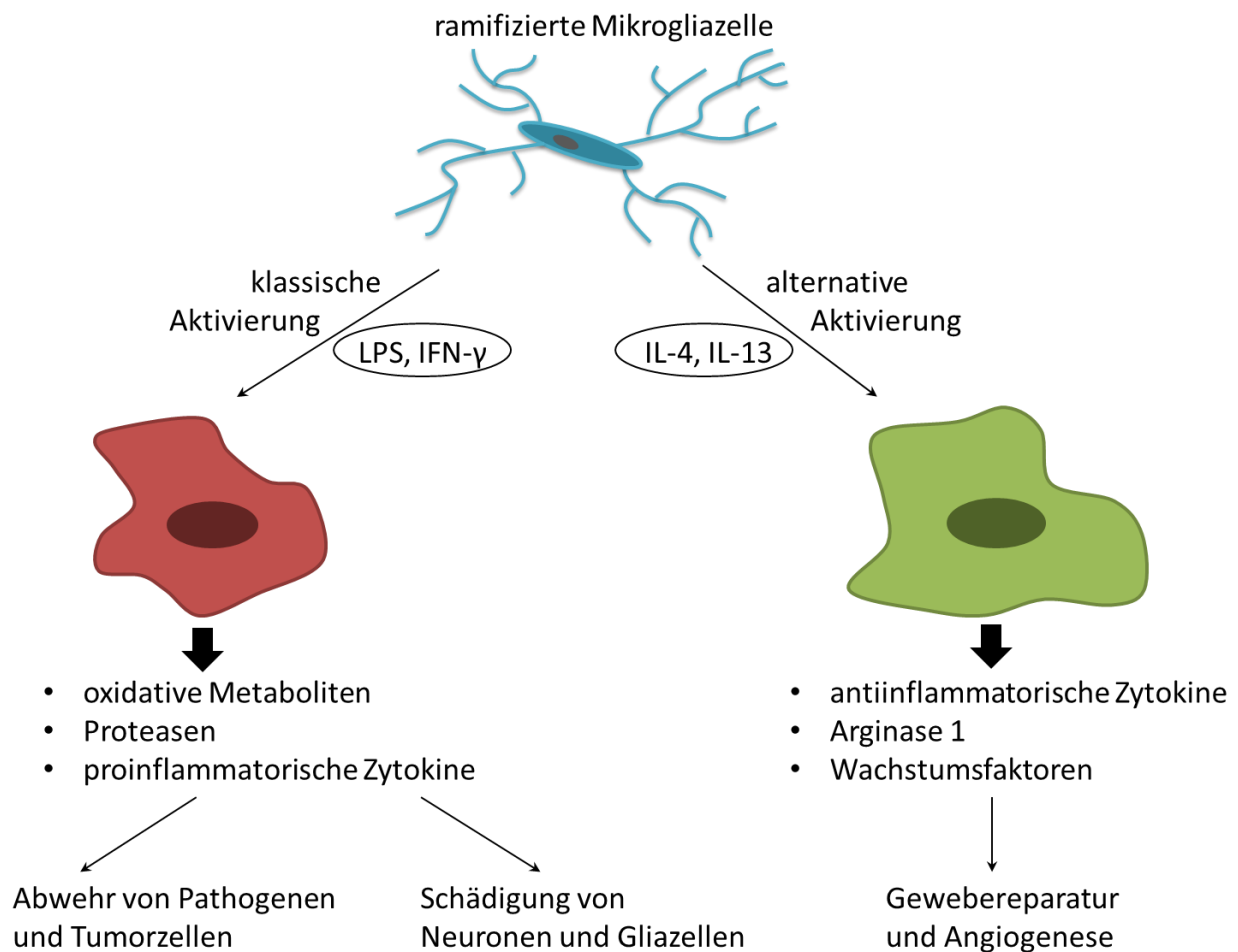


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der Mikrogliaaktivierung. Die Fortsätze der ramifizierten Mikroglia befinden sich ständig in Bewegung und scannen so die Umgebung auf eventuelle Gefahren für das ZNS. Je nach Art des Stimulus für die Mikrogliaaktivierung kann diese schädliche oder heilsame Wirkung auf das Gewebe haben. Modifiziert nach CZECH et al. (2011).

entsprechende Antigen wird durch MHC II präsentiert (GRAEBER u. STREIT 2010). Wenn sich das Gewebe von einer Verletzung erholt, können Mikroglia durch Apoptose eliminiert werden (JONES et al. 1997; GRAEBER u. STREIT 2010).

Die Aktivierung der Mikroglia kann akut oder chronisch sein. Dies ist sowohl von der Dauer des externen Signals, als auch von dem auslösenden Faktor selbst abhängig, das heißt, ob es sich bei diesem um Zellstress durch eine Infektion, Entzündung oder Signale beschädigter Neurone handelt (GRAEBER u. STREIT 2010). Die Aktivierung während Stress unterscheidet sich zum Beispiel von der während einer Entzündung (SUGAMA et al. 2009). Chronische Mikrogliaaktivierung kann zu einer mikroglialen Überreaktion führen, die ihre Degeneration zu Folge hat (LIU et al. 2001; POLAZZI u. CONTESTABILE 2006). Durch das Fehlen der mikroglialen Unterstützung kommt es sekundär zum Neuronenuntergang.

Mikrogliazellen stellen einen wesentlichen Bestandteil der Entzündungsprozesse bei experimentellen Epilepsiemodellen sowie humaner Epilepsie dar. Ihre Aktivierung kann hierbei allein durch epileptische Anfälle, ohne das Auftreten von Zelltod erfolgen (VEZZANI et al. 2000; DUBE et al. 2010; ZOLKOWSKA et al. 2012). Der genaue Mechanismus der Erkennung neuronaler Hyperexzitabilität durch die Mikrogliazellen ist bisher ungeklärt. In epileptischem Gewebe können Mikrogliazellen morphologisch gesehen aktiviert bleiben, ohne jedoch Zytokine zu synthetisieren (RAVIZZA et al. 2008; MAROSO et al. 2011). Experimentelle Studien haben gezeigt, dass die Intensität der Zytokinausschüttung mit der Anfallshäufigkeit korreliert (RAVIZZA et al. 2008). So ist auch das Ausmaß der Mikrogliaaktivierung abhängig von der Anfallsdauer sowie der Krankheitsdauer pharmakoresistenter Epilepsien (BOER et al. 2006; RAVIZZA et al. 2006). Weiterhin konnte in experimentellen Studien gezeigt werden, dass Mikrogliazellen durch die Ausschüttung proinflammatorischer Moleküle in der Lage sind, die Anfallsschwelle zu senken (VEZZANI et al. 2011; GALIC et al. 2012). Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass eine Störung der homöostatischen Funktion der Mikrogliazellen zu einer Beteiligung an der Initiation sowie dem Verlauf der Epileptogenese führen kann (DEVINSKY et al. 2013b). Neuronale Erregung kann also Entzündung fördern und umgekehrt. Frühere Studien konnten zudem zeigen, dass eine antiinflammatorische oder immunsuppressive Behandlung bei ansonsten pharmakoresistenten Patienten zur Anfallskontrolle bei manchen Epilepsieformen führt (NAJJAR et al. 2008; NAJJAR et al. 2011). Ein besseres Verständnis der Rolle der Mikroglia bei der Epileptogenese könnte die Basis für neue therapeutische Möglichkeiten bei der Behandlung der Epilepsie sein (DEVINSKY et al. 2013b).

3. Anfallsinduzierte neuronale Plastizität

3.1. Neurogenese

Als Neurogenese wird die lebenslange Neubildung von Nervenzellen im adulten Säugetiergehirn bezeichnet. Diese konnte erstmals in den 1960er Jahren beim Nagetier nachgewiesen werden (ALTMAN u. DAS 1965). Die Forscherwelt hielt jedoch weiterhin an dem Irrglaube der fehlenden Regenerationsfähigkeit des Gehirns fest. Erst 1998 wurde diese Erkenntnis auch für das menschliche Gehirn bestätigt (ERIKSSON et al. 1998; KEMPERMANN et al. 1998). Weitere Arbeiten der letzten Jahrzehnte konnten den lebenslang stattfindenden Prozess der neuronalen

Plastizität bekräftigen (GAGE 2002; GOULD 2007; FANG et al. 2011; MING u. SONG 2011).

Die potentesten Areale der Neurogenese im adulten Gehirn befinden sich in der Hippocampusformation (hippocampale Neurogenese) und im *Bulbus olfactorius* (Neurogenese des olfaktorischen Systems). Die erforderlichen Stammzellen sitzen in der subgranulären Zone (SGZ) des Gyrus dentatus (GD) des Hippocampus (ALTMAN u. DAS 1965; GAGE et al. 1998) und in der subventrikulären Zone (SVZ) der anterolateralen Ventrikel (ALTMAN 1969; GAGE 2002; FANG et al. 2011). Auch in anderen Gehirnregionen findet kontinuierlich Neurogenese statt (z.B. *Substantia nigra*, Neocortex), jedoch mit einer viel geringeren *Turnover*-Rate (GOULD et al. 1999; BERNIER et al. 2002; GOULD 2007). Die gesteigerte hippocampale Neurogenese stellt die physiologische, zelluläre Grundlage für den reibungslosen Ablauf von Lern- und Gedächtnisvorgängen dar (SHORS et al. 2001). Bei pathologischem Geschehen ist sie Folge von z.B. Veränderungen in der Mikroumgebung der SGZ (HATTIANGADY et al. 2004) und wird zudem auch als Folge von epileptischen Anfällen diskutiert (BENGZON et al. 1997; PARENT u. LOWENSTEIN 2002; KOKAIA 2011). Im Folgenden soll vor allem auf die hippocampale Neurogenese eingegangen werden, da der Hippocampus maßgeblich an Lern- und Gedächtnisvorgängen beteiligt ist (SODERLUND et al. 2012) und große pathophysiologische Bedeutung bei der Epilepsieentstehung besitzt (FANG et al. 2011).

Die Stammzellen der SGZ im Hippocampus teilen sich asymmetrisch und produzieren hierdurch jeweils eine Tochter-Vorläuferzelle und eine weitere Stammzelle. Die entstandenen Vorläuferzellen proliferieren lebenslang und wandern dann in die darüber liegende Körnerzellschicht, wo sie zu reifen Körnerzellen ausdifferenzieren (ALTMAN u. DAS 1965; CAMERON et al. 1993). Die neugebildeten Neurone stellen über ihre Dendriten eine Verbindung zu der Molekularschicht des GD her. Über ihre Axone nehmen sie Kontakt mit den Pyramidenzellen des Hilus und der *Cornu ammonis*₃ (CA₃, Ammonshorn)-Region auf (HASTINGS u. GOULD 1999; MARKAKIS u. GAGE 1999). Hierdurch werden die neugebildeten Neurone fest in das neuronale Netzwerk des Hippocampus integriert (VAN PRAAG et al. 2002). Hormone, Umweltreize, Neurotransmittersysteme, physische Bewegung, Strahlungen, neuropathologische Zustände und Wachstumsfaktoren beeinflussen die Proliferation der neuronalen Vorläuferzellen

(LEHMANN et al. 2005). Im Rahmen der Epileptogenese (s.u.) kommt es zu neuropathologischen Veränderungen des ZNS (DALBY u. MODY 2001), unter anderem zu einer gesteigerten Neurogenese (CRESPEL et al. 2005; ENGEL et al. 2011). Das Besondere hierbei ist, dass einige der neugebildeten Neuronen ein atypisches Verhalten aufweisen. Sie bilden Axone aus, die in die supragranuläre Zone reichen (BUCKMASTER et al. 2002) und somit keinen Kontakt mehr mit Pyramidenzellen der CA₃-Region aufnehmen. Stattdessen verbinden sie sich rückläufig mit anderen Körnerzellen des GD. Hierdurch kann es zur Entstehung von amplifizierenden Feedback-Kreisläufen kommen, die maßgeblich an der Anfallsentstehung und –ausbreitung beteiligt sind. Das atypische Verhalten der neugebildeten Nervenzellen zeigt sich zudem in der Einwanderung einiger Vorläuferzellen in den Hilus des Hippocampus, wo sie dann zu sogenannten ektopischen Körnerzellen ausdifferenzieren (SCHARFMAN et al. 2003; PARENT et al. 2006). Bei den ektopischen Körnerzellen fand man in verschiedenen Studien persistierende basale Dendriten, die in normal entwickelten Körnerzellen nur transient auftreten (VON CAMPE et al. 1997; DASHTIPOUR et al. 2003; PEKCEC u. POTSCHKA 2007). Diese sind möglicherweise als prokonvulsive, strukturelle Netzwerkveränderungen zu deuten, die zur Entstehung und Ausbreitung der epileptischen Anfälle beitragen (PEKCEC u. POTSCHKA 2007). Bisher konnte jedoch die Bedeutung der gesteigerten Neurogenese bezüglich Epilepsieerkrankungen nicht eindeutig geklärt werden (KOKAIA 2011).

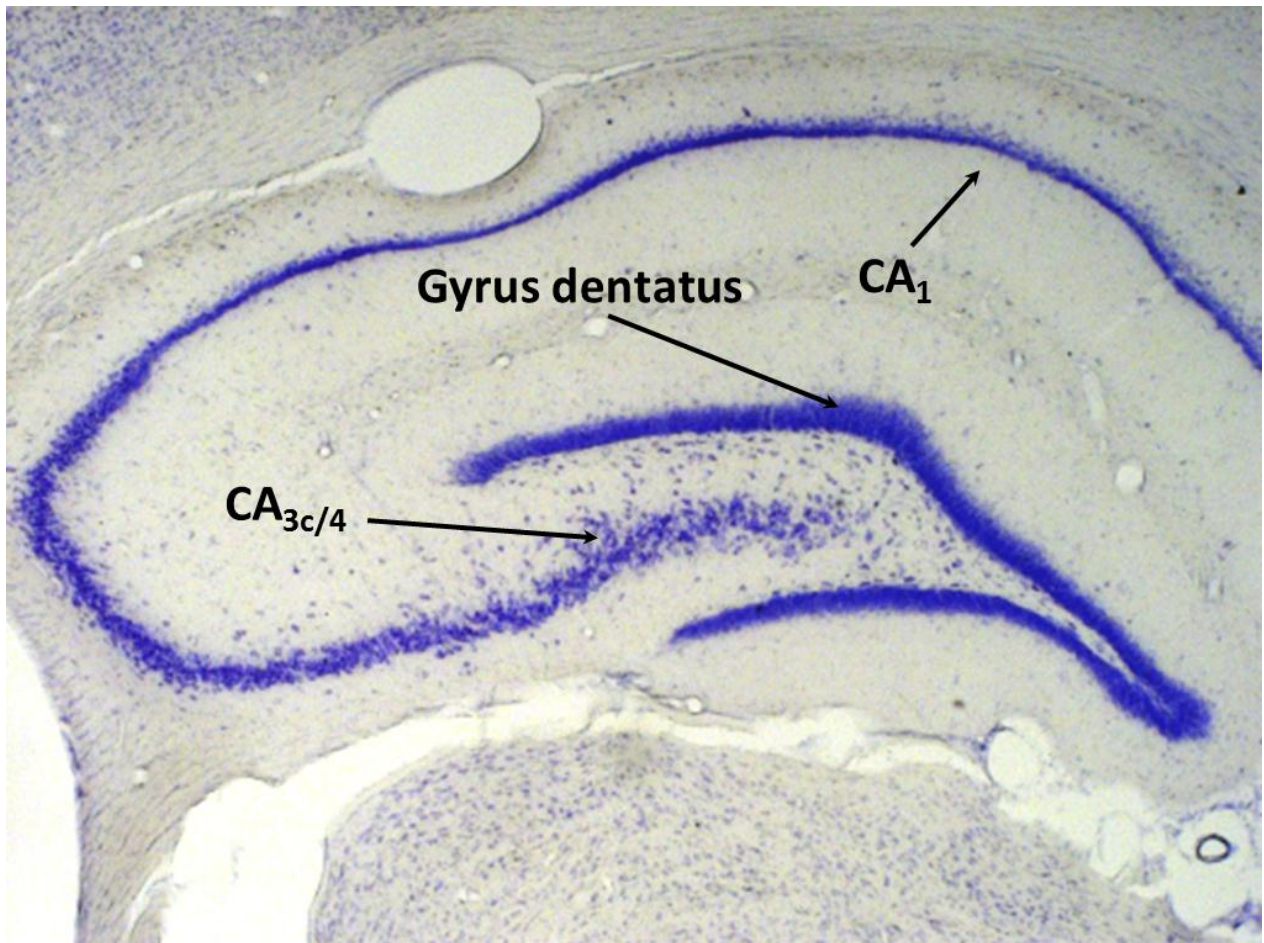


Abb. 3: Hippocampale Formation im Gehirn einer Ratte. Gyrus dentatus, CA₁ sowie CA_{3c/4} sind hier durch Pfeile markiert.

3.2. Neurodegeneration

Die am besten beschriebene zelluläre Veränderung im Zusammenhang mit der Epileptogenese stellt die Neurodegeneration dar (PITKANEN u. LUKASIUK 2009). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass bestimmte Anfallstypen zu Neurodegeneration führen (HENSHALL u. SIMON 2005; ROCHA et al. 2007). Hierfür sind sowohl nekrotische als auch apoptotische Prozesse verantwortlich (FUJIKAWA et al. 2000). Ein häufig beobachtetes Merkmal der TLE stellt die hippocampale Sklerose dar, welche durch extensiven Zellverlust (> 50%) in der CA₁ und der CA_{3a}-Region des Hippocampus sowie des Hilus des GD gekennzeichnet ist (ENGEL 1996; FISHER et al. 1998). Besonders anfällig für neurodegenerative Veränderungen im Hippocampus sind sowohl die Pyramidenzellschicht als auch der Hilus des GD. Im Bereich der Pyramidenzellschicht sind vor allem die CA₁- sowie die CA_{3c/4}-Region betroffen (Abb. 3). Die CA₂- und die CA_{3a}-Region scheinen eher unempfindlich für eine anfallsinduzierte Neurodegeneration zu sein (SLOVITER 2005). Neben diesen

hippocampalen Veränderungen tritt die Neurodegeneration auch in anderen Hirnregionen, wie dem piriformen Cortex auf (FUJIKAWA et al. 2000). Ein starker Neuronenuntergang wird mit weiteren plastischen Veränderungen in Verbindung gebracht und ist zudem an der Störung der hippocampalen Funktion beteiligt (SLOVITER 1999; DUDEK et al. 2002).

3.3. Einfluss von Mikroglia

Wie in Kapitel II.2 bereits ausführlich beschrieben können Mikroglia sowohl unterstützende, als auch schädliche Wirkungen auf die adulte Neurogenese entfalten. Dies ist von ihrem Aktivierungsstatus abhängig. Als ramifizierte, überwachende Mikroglia tragen sie durch Phagozytose der abgestorbenen neugebildeten Neuronen zur adulten Neurogenese bei (SIERRA et al. 2010). Über die Hälfte der täglich in der SGZ des GD neu gebildeten Neuronen stirbt in den ersten Tagen bis Wochen ab, höchstwahrscheinlich durch Apoptose (BIEBL et al. 2000; CAMERON u. MCKAY 2001; KEMPERMANN et al. 2003). Durch z.B. LPS auf dem klassischen Weg aktivierte Mikroglia schütten verschiedene Zytokine, wie zum Beispiel IL-1 β , TNF- α und IL-6 aus. Diese Entzündungsmediatoren beeinträchtigen die hippocampale Neurogenese durch eine verminderte Überlebensrate der neu gebildeten Neuronen, nicht jedoch die Proliferation (EKDAHL et al. 2003; MONJE et al. 2003; BASTOS et al. 2008). Spätere Studien deuten indessen auf einen möglichen Einfluss der klassischen Aktivierung auf die Proliferationsrate der Vorläuferzellen hin und kommen somit zu einem anderen Schluss (FUJIOKA u. AKEMA 2010). Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte das unterschiedliche Geschlecht sowie Alter der für die verschiedenen Studien verwendeten Ratten sein (MONJE et al. 2003; FUJIOKA u. AKEMA 2010). Weiterhin hat die klassische Aktivierung der Mikroglia einen Einfluss auf die Integration neu gebildeter Neuronen in das bestehende Netzwerk und auf die zellulären Eigenschaften der überlebenden Neurone (JAKUBS et al. 2008; BELARBI et al. 2012). Wodurch genau der Entzündungsprozess die hippocampale Neurogenese beeinflusst, ist noch nicht vollständig geklärt. Die Ergebnisse verschiedener Studien deuten jedoch darauf hin, dass die Mikrogliaaktivierung und die daraus resultierende Zytokinausschüttung dafür verantwortlich sind (VALLIERES et al. 2002; MONJE et al. 2003; HOFER et al. 2011; GREEN et al. 2012). Die auf alternativem Weg aktivierte Mikroglia spielt hingegen eine zentrale Rolle in regenerativen Prozessen (COLTON 2009). Sie erfolgt meist als kompensatorische Antwort auf eine vorangegangene

Entzündungsreaktion, um die Regenerationsprozesse zu beschleunigen (CACCI et al. 2008; THORED et al. 2009). Es kommt zur Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10, TGF- β und Wachstumsfaktoren wie IGF (insulin-like growth factor), NGF (nerve growth factor) und BDNF (brain-derived neurotrophic factor). Es wird vermutet, dass antiinflammatorische Zytokine die Neurogenese unterstützen (BATTISTA et al. 2006; THORED et al. 2009; MATHIEU et al. 2010).

4. Antiepileptogene und krankheitsmodifizierende Strategien

4.1. Einführung

Der Begriff Epileptogenese beschreibt den Zeitraum der Entstehung einer symptomatischen Epilepsie, beginnend mit dem initialen Insult (Trauma, Hirntumor, Hirnschlag, Enzephalitis, fiebrige Krampfanfälle etc.) bis hin zum erstmaligen Auftreten spontaner Krampfanfälle (PITKANEN u. LUKASIUK 2011). Es handelt sich hierbei um einen dynamischen Prozess, welcher über Monate hinweg mit kontinuierlichen morphologischen und funktionellen Veränderungen auf neuronaler Ebene, Entzündungsprozessen und einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) einhergeht (HERMAN 2002; PITKANEN u. LUKASIUK 2011). Dieses Zeitfenster stellt einen möglichen Angriffspunkt zur Verhinderung der Epilepsieentstehung und der Entwicklung spontaner Krampfanfälle dar (HERMAN 2002). Eine antiepileptogene Wirkung pharmakologischer Substanzen wäre das oberste Ziel einer prophylaktischen Behandlung. Eine krankheitsmodifizierende Wirkung im Sinne einer erniedrigten Anfallsfrequenz, geringeren Anfallsdauer und/oder –schwere ist durch pharmakologische Beeinflussung bereits möglich (JUNG et al. 2006; POLASCHECK et al. 2010). Auch eine Verhinderung oder Verminderung der Neurodegeneration, psychiatrischer Komorbiditäten, sowie der kognitiven Defizite wurde bereits erfolgreich erprobt (PITKANEN et al. 2005; BRANDT et al. 2006; CUNHA et al. 2009). Neben der Neuroprotektion und der Modulation neuronaler Hyperexzitabilität, stellt die entzündungshemmende Behandlung eine bedeutsame und hoffnungsvolle Strategie zur Modulation der Epileptogenese und der damit assoziierten Komorbiditäten dar (VEZZANI u. GRANATA 2005; Vezzani u. Baram 2007; RIAZI et al. 2010). Experimentelle Studien im SE-Modell konnten zeigen, dass Entzündungsprozesse zunächst zu einer Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten führen, welche anschließend zu einer Schädigung von Neuronen und Endothelzellen der BHS führen (DE SIMONI et al. 2000; TURRIN u. RIVEST 2004; VOUTSINOS-

PORCHE et al. 2004; MARCON et al. 2009). Die Modulation der Mikrogliafunktion stellt somit einen vielversprechenden Ansatzpunkt zur Entzündungshemmung dar, da Mikroglia sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte haben kann (KETTENMANN et al. 2011). Eine Vielzahl von Untersuchungen konnte weiterhin zeigen, dass der calciumabhängige Kaliumkanal KCa3.1 maßgeblich an der Mikrogliaaktivierung beteiligt ist (KHANNA et al. 2001; KAUSHAL et al. 2007; CHEN et al. 2011). Eine Blockade dieses Kanals könnte zu einer Hemmung der proinflammatorischen Effekte führen und gleichzeitig erwünschte antiinflammatorische und neurotrophe Effekte erhalten (KAUSHAL et al. 2007).

4.2. Calciumabhängiger Kaliumkanal KCa3.1

Der calciumabhängige Kaliumkanal KCa3.1 ist auch bekannt als IK1, SK4 oder KCNN4. Er besteht aus vier α -Untereinheiten, von denen jede sechs transmembrane Segmente besitzt. Deren C-Terminus ist mit Calmodulin komplexiert, welches als Calciumsensor dient (WULFF et al. 2001). Zudem befindet sich hier die Histidin-Phosphorylierungsstelle H358, die bekanntermaßen an der Aktivierung des Kanals beteiligt ist. Eine schematische Darstellung von KCa3.1 ist in Abb. 4 zu sehen. Durch seinen homotetrameren Aufbau besitzt der Kanal also vier Calmodulin-Calciumsensoren, was die hohe Sensitivität von KCa3.1 auf Veränderungen bezüglich der intrazellulären Calciumkonzentration erklärt. Durch die Modulation der Calciumsignalwirkung und des Membranpotenzials spielt KCa3.1 eine bedeutende Rolle bei der Mikrogliaaktivierung. Zwar ist seine Rolle bezüglich der T-Zellaktivierung bereits viel detaillierter erforscht (CAHALAN u. CHANDY 2009), die Beeinflussung der Mikrogliaaktivierung läuft jedoch ähnlich ab. KCa3.1 reguliert die Mikrogliaaktivierung durch Modulation des Calciumeinstroms. Ein Anstieg des intrazellulären Calciums aktiviert KCa3.1 und führt somit zu einem Kaliumausstrom. Die hierdurch entstandene Membranhyperpolarisation erhöht schließlich die Treibkraft für einen Calciumeinstrom durch speicheraktivierte, einwärts gleichrichtende Calciumkanäle wie CRAC (*Ca²⁺ release activated Ca²⁺ channel*) (MAEZAWA et al. 2012). Die dadurch fortschreitende Erhöhung des intrazellulären Calciums führt zur Produktion von entzündungsfördernden Chemokinen und Zytokinen durch T-Zellen, Makrophagen und Mastzellen (GHANSHANI et al. 2000; CRUSE et al. 2006). Zudem ist der KCa3.1-abhängige Calciumeinstrom an der Migration von Mikroglia (SCHILLING et al. 2004) beteiligt und scheint eine Rolle am Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) medierten oxidativen

burst, der Produktion von NO und der mikrogliavermittelten Neurodegeneration zu spielen (KHANNA et al. 2001; KAUSHAL et al. 2007).

KCa3.1-Kanäle werden überall im Körper exprimiert, kommen jedoch vorwiegend in von hämatopoetischen Stammzellen abstammenden Zellen (z.B. Mastzellen, Monozyten, Makrophagen), sowie in peripherem Gewebe (z.B. Fibroblasten, sekretorischen Epithelzellen) vor (WULFF u. CASTLE 2010). Der Kanal wird dagegen nicht in erregbaren Zellen wie Neuronen und Kardiomyozyten exprimiert (ISHII et al. 1997; JOINER et al. 1997; LOGSDON et al. 1997). Dies macht KCa3.1 zu einer interessanten therapeutischen Zielstruktur für verschiedene ZNS-Erkrankungen. KCa3.1 scheint also von allen parenchymalen Zellen des Großhirns vor allem in Mikroglia exprimiert zu werden, sodass ein ZNS-gängiger KCa3.1-Blocker relativ selektiv für Mikroglia wäre und somit nachteilige Wirkungen auf die neuronalen Funktionen verhindert werden könnten (MAEZAWA et al. 2012).

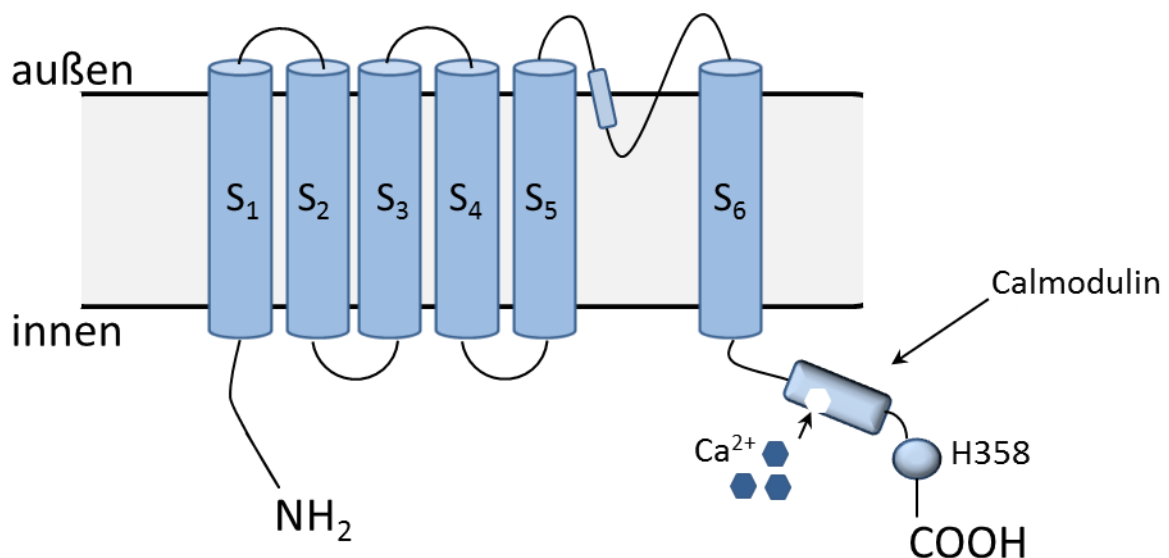


Abb. 4: Schema der Struktur von KCa3.1. Dargestellt sind die sechs transmembranen Untereinheiten und Calmodulin, welches an die Calmodulin-Bindungsstelle des C-Terminus gebunden ist. Außerdem ist hier die Lage der Histidin-Phosphorylierungs-Stelle (H358) zu sehen, welche bekanntermaßen die Aktivierung des Kanals beeinflusst. Modifiziert nach WULFF u. CASTLE (2010).

4.3. Triarylmethan-34

Aufgrund der wichtigen Rolle von KCa3.1 bei der Regulation verschiedener Immunzellfunktionen, wurde im Jahr 2000 TRAM-34 als potenter und selektiver Blocker entwickelt (Abb. 6) (WULFF et al. 2000). Als Vorlage diente hierbei das Antimykotikum Clotrimazol, ein wirkungsstarker, jedoch wenig tolerierter KCa3.1-

Blocker. TRAM-34 besitzt bei weitaus geringeren Nebenwirkungen eine ähnliche Wirkstärke wie Clotrimazol. Toxizitätsstudien bei Nagern (28 Tage und sechs Monate) konnten seine Unbedenklichkeit bestätigen. Hierbei konnten weder Verhaltensveränderungen, noch neurologische Beeinträchtigungen festgestellt werden. Es wurden lediglich geringe gastrointestinale Veränderungen beobachtet, die auf die chronische Verabreichung von TRAM-34 zurückzuführen waren. Hierzu zählten eine Zunahme an Becherzellen sowie Hyperplasie der Mukosa in Kolon und Zäkum. Leberveränderungen betrafen männliche Tiere stärker als weibliche Tiere. Hierbei kam es zu Hepatozytenschwellung sowie Vakuolisierung. Assoziierte entzündliche Veränderungen oder Nekrose konnten jedoch nicht festgestellt werden. TRAM-34 ist stark lipophil und besitzt hierdurch das Vermögen, die BHS leicht zu passieren. Die Plasmaeliminationshalbwertszeit beträgt bei Ratten und Primaten etwa zwei Stunden. Trotz Versuchen der Mikroverkapselung ist TRAM-34 nicht oral verfügbar (AL-GHANANEEM et al. 2010). Seine hohe Selektivität gegenüber anderen Kaliumkanälen sowie seine Verfügbarkeit für Forschergruppen macht TRAM-34 zur derzeit wichtigsten Substanz bei der Erforschung der Pathophysiologie von KCa3.1 (MAEZAWA et al. 2012).

Die Ergebnisse zahlreicher *in vitro* wie *in vivo* Studien deuten darauf hin, dass KCa3.1-Blocker und hier insbesondere TRAM-34 die Entzündungsprozesse im Gehirn verringern können und somit neuroprotektive Eigenschaften besitzen. So konnte in Zellkultur gezeigt werden, dass TRAM-34 die durch Amyloid- β -Oligomere (A β O) hervorgerufene Mikrogliaaktivierung und somit die mikrogliavermittelte neuronale Toxizität hemmt (MAEZAWA et al. 2011). Eine weitere *in vitro* Studie belegte eine durch TRAM-34 verminderte Mikrogliaaktivierung sowie eine hierdurch verminderte Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und eine daraus resultierende erniedrigte Konzentration an NO und Peroxynitrit (KAUSHAL et al. 2007). Auch in einem Modell der ischämischen Apoplexie an Ratten konnte durch TRAM-34 die Mikrogliaaktivierung gehemmt werden und somit die Größe des Infarktgebietes sowie die neurologischen Defizite reduziert werden (CHEN et al. 2011). Des Weiteren führt die intraokulare Injektion von TRAM-34 zu einer reduzierten Degeneration der retinalen Ganglionzellen nach einer Transektion des *Nervus opticus* bei Ratten (KAUSHAL et al. 2007). Die KCa3.1-Blockade verhinderte in diesem Fall weder die Phagozytose beschädigter Neuronen noch die Ausrichtung der Mikrogliazellen entlang der beschädigten Axone. Die Anzahl der überlebenden

retinalen Ganglionzellen wurde hierdurch jedoch erhöht. Dies ist wahrscheinlich auf die verminderte Produktion und Sekretion von neurotoxischen Molekülen in der Retina zurückzuführen. Der Calciumeinstrom während der Phagozytose scheint durch einen umgekehrten Natrium-Calcium-Austausch und nicht durch KCa3.1 regulierte CRAC-Kanäle vermittelt zu sein (NEWELL et al. 2007). Die Blockade von KCa3.1 scheint also recht selektiv für bestimmte Signalwege zu sein. In einem Mausmodell der Rückenmarksverletzung konnte TRAM-34 proinflammatorische Mediatoren und das Auftreten sekundärer Schäden reduzieren. Weiterhin wurde durch die Behandlung mit TRAM-34 eine deutliche Verbesserung der Beweglichkeit erzielt (BOUHY et al. 2011). Im Mausmodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis konnte TRAM-34 die Produktion der Zytokine INF- γ und TNF- α im Gehirn und im Rückenmark reduzieren (REICH et al. 2005). Diese und zahlreiche andere Studien zeigen die positiven Effekte von KCa3.1-Blockern (KÖHLER et al. 2003; TOYAMA et al. 2008). Sie scheinen primär durch Hemmung der schädlichen Wirkung von Mikroglia und Makrophagen hervorgerufen zu sein.

5. Verhaltensuntersuchungen

5.1. Einführung

Um die kognitiven Fähigkeiten bei Versuchstieren erfassen und bewerten zu können und so die Mechanismen psychiatrischer Erkrankungen zu verstehen, sind entsprechende Tiermodelle nötig. Epilepsieassoziierte Verhaltensstörungen, sowie Lern- und Gedächtnisdefizite konnten im Rahmen zahlreicher Studien bereits mehrfach nachgewiesen werden (SANTOS et al. 2000; ZHOU et al. 2007; SEEGER et al. 2011).

Die Ergebnisse aus tierexperimentellen Studien lassen sich jedoch nicht exakt auf Humanpatienten übertragen. Trotz der präzisen Messmöglichkeiten ist es zudem derzeit noch nicht möglich, alle Verhaltensweisen der Tiere befriedigend zu interpretieren. Der genetische Hintergrund der Tiere sowie Umwelteinflüsse spielen bezüglich ihrer emotionalen Reaktion auf die verschiedenen Tests eine wichtige Rolle (RAMOS 2008). Im Folgenden sollen die im Zuge der vorliegenden Studie angewendeten Verhaltensuntersuchungen kurz erläutert werden.

5.2. Verhaltensmodelle

5.2.1. Open Field

Das *Open Field* (Offenfeld, OF) wurde 1934 erstmals beschrieben (HALL 1934) und zählt zu den ältesten und am häufigsten verwendeten Verhaltenstests. Quantifizieren lassen sich hierbei sowohl das angstassoziierte Verhalten als auch die Lokomotion der Tiere, d.h. die Quantität und Qualität der Bewegung (WALSH u. CUMMINS 1976). Die Verhaltensuntersuchungen werden in einer nach oben hin offenen, jedoch allseits von Wänden umgebenen Arena durchgeführt. Die Arenen unterscheiden sich hinsichtlich der Beleuchtung (direkte, indirekte Beleuchtung oder Rotlicht), der Form (quadratisch, kreisförmig, rechteckig) und dem Vorhandensein von diversen Objekten in der Arena (PRUT u. BELZUNG 2003). Das Tier wird ins Zentrum oder in Wandnähe in die Arena eingesetzt und für meist fünf Minuten beobachtet (PRUT u. BELZUNG 2003). Dabei wird die horizontale Bewegung, die vertikale Aktivität (*rearing*) und das Putzverhalten (*grooming*) erfasst. Das Prinzip dieses Tests beruht auf der verhaltensbiologischen Beobachtung, dass Nager ihnen unbekannte, hell erleuchtete freie Flächen eher vermeiden. Das Verhalten im OF ist geprägt durch eine Mischung aus natürlichem Erkundungsdrang und Angst vor der ihnen unbekannten Umgebung. Normalerweise bevorzugen Nager in dieser Situation eher die Nähe zur Wand, als sich im Zentrum der Arena zu bewegen. Dieses Abtasten der Wände durch die Vibrissen wird Thigmotaxis genannt. Eine erhöhte Aufenthaltsdauer der Tiere im Zentrum oder eine verringerte Latenzzeit bis zum Eintritt in das Zentrum weisen auf eine bestehende Verminderung von Angstzuständen (Anxiolyse) hin (PRUT u. BELZUNG 2003). Chronische Epilepsie, die bei Ratten durch einen elektrisch-induzierten SE verursacht wurde, führt bei Ratten nachweislich zu einem hyperaktiven Verhalten im OF (BRANDT et al. 2006; SEEGER et al. 2011).

5.2.2. Black and White Box

Im Jahr 1980 wurde die *Black and White Box* (BWB) zum ersten Mal beschrieben (CRAWLEY u. GOODWIN 1980) und dient seither als wichtiger Test zum Nachweis angstassoziierten Verhaltens. Das Verbringen der Tiere in eine neue Umgebung löst das natürliche Explorationsverhalten aus, welches jedoch durch offene Areale und hell beleuchtete Flächen eingeschränkt wird (CHRISTMAS u. MAXWELL 1970; SHIMADA et al. 1995). Die Apparatur besteht aus einer rechteckigen Box, die in zwei Bereiche geteilt ist. Der weiße Teil der Box stellt den flächenmäßig größeren dar und

ist hell beleuchtet. Der schwarze Teil der Box ist kleiner und nur schwach beleuchtet. Die beiden Bereiche sind durch einen schmalen Durchgang miteinander verbunden. Um nun angstassoziiertes Verhalten erfassen zu können, werden die Tiere mit Blickrichtung zum Durchgang in die weiße Box gesetzt und fünf Minuten lang beobachtet (SANCHEZ 1997). In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die Gabe anxiolytischer Substanzen wie z.B. Diazepam zu einer vermehrten Exploration des weißen Areals führte (COSTALL et al. 1989; SHIMADA et al. 1995).

5.2.3. Elevated Plus Maze

Das *Elevated Plus Maze* (EPM) ist einer der wichtigsten und am häufigsten eingesetzten Tests, um angstassoziiertes Verhalten zu evaluieren (PELLOW et al. 1985). Es handelt sich hierbei um eine erhöhte plusförmige Apparatur, die aus zwei offenen und zwei seitlich durch Wände geschlossenen Armen besteht (PINHEIRO et al. 2007). Das Einsetzen in die Apparatur löst bei den Tieren sowohl Angst, als auch Neugierde aus (MONTGOMERY u. MONKMAN 1955). So wird mit Hilfe dieses Tests evaluiert, ob die Tiere sich für den sicheren Ort (geschlossene Arme) oder für die riskantere Exploration der neuen Umgebung entscheiden (SALUM et al. 2000). Der Versuchsdurchgang beginnt mit dem Einsetzen des Tieres in das Zentrum der Apparatur und dauert fünf Minuten. In dieser Zeit soll das Vermeidungsverhalten der Tiere laut Montgomery besonders ausgeprägt sein (PELLOW et al. 1985). Die Aufenthaltsdauer in den jeweiligen Bereichen sowie der Übertritt zwischen den einzelnen Armen gibt Aufschluss über die Risikobereitschaft der Tiere. Halten sich die Tiere vermehrt auf den geschlossenen Armen auf und meiden die offenen Arme, auf denen keine Möglichkeit zur Thigmotaxis besteht, kann von einem gesteigerten angstassoziierten Verhalten ausgegangen werden (RODGERS u. DALVI 1997). In einigen Studien konnte bei chronisch epileptischen Ratten bereits eine gesteigerte Lokomotion sowie eine erhöhte Aufenthaltsdauer in den aversiven offenen Armen festgestellt werden (BRANDT et al. 2006; SEEGER et al. 2011).

5.2.4. Morris Water Maze

Im Jahre 1981 entwickelte der britische Neurowissenschaftler Richard G. Morris ein Wasserlabyrinth (*Morris Water Maze*, MWM), um das räumliche Lernvermögen und die Gedächtnisleistung an Laborratten zu überprüfen (MORRIS 1984). Es zählt seither zu den am häufigsten verwendeten Verhaltenstests (D'HOOGE u. DE DEYN 2001). Die Tiere sollen hierbei mit Hilfe von externen Hinweisen lernen, eine

versteckte Plattform von vier verschiedenen Startpunkten aus, in einem mit Wasser gefüllten Schwimmbecken zu finden. Der Lernerfolg wird im anschließenden Extinktionsdurchgang (*spatial probe*, Spatialprobe) getestet, in dem die Plattform wieder entfernt und die Zeit gemessen wird, die das Tier in der Region der ehemaligen Plattformposition verbringt (MORRIS 1984). Dem Erfolg dieses Testes liegt die angeborene Aversion der Tiere gegen Wasser zugrunde (HODGES 1996). Diese motiviert die Tiere, nach einem Ausweg aus dem Wasser zu suchen. Dabei erstellen sie mit Hilfe von äußeren Hinweisen (*cues*) eine Art „kognitive Landkarte“, die zu einem zunehmend schnelleren Auffinden der Plattform im Verlauf der Trainingsphase beiträgt (HODGES 1996). Des Weiteren handelt es sich beim MWM um einen äußerst sensitiven Test zur Erfassung von Schäden im Bereich des Hippocampus (MORRIS et al. 1982; SUTHERLAND et al. 1982; BANNERMAN et al. 1999). Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die Tiere im Wasser keine aromatischen Hinweise zur Orientierung verwenden können (SHARMA et al. 2010). Epileptische Tiere weisen in diesem Versuchsaufbau ein gestörtes räumliches Lernvermögen und eine verminderte Gedächtnisleistung auf. Hiervon sind Tiere verschiedener Spezies, Stämme und unterschiedlichen Alters betroffen (STAFSTROM 2006). In bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass Ratten mit einem elektrisch induzierten SE die Plattform im MWM schwerer auffinden, als die jeweiligen Kontrolltiere (BRANDT et al. 2006; SEEGER et al. 2011).

III. ZIELSETZUNG UND ARBEITSHYPOTHESEN

Epilepsie zählt sowohl bei Hund und Katze, als auch beim Menschen zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen des ZNS. Bislang stellt die lebenslange Pharmakotherapie die bedeutendste Therapieform dar. Die Therapieerfolge sind jedoch häufig nicht zufriedenstellend, sodass trotz der medikamentösen Behandlung eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität die Folge ist. Derzeit verwendete gängige AEs zielen zudem lediglich auf eine Anfallsfreiheit ab und greifen nicht in die zugrundeliegende Krankheit und deren Entstehung ein. Der experimentelle Fokus lag bisher auf der Untersuchung der Beteiligung von Neuronen, Ionenkanälen, Transportern sowie exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmission. Der Effekt gängiger AEs auf Gliazellen und das Immunsystem wurde hierbei bislang weitgehend vernachlässigt. Zahlreiche Studien weisen jedoch daraufhin, dass Entzündungsprozesse im ZNS eine wichtige Rolle bei der Epileptogenese sowie der Pharmakoresistenz eines großen Teils der Patienten spielen. Im Zuge dessen konnte die Wirksamkeit von antiinflammatorischen oder immunsuppressiven Therapien bei einigen Epilepsieformen belegt werden. Hierbei wurde eine Anfallskontrolle bei ansonsten pharmakoresistenten Patienten erzielt. Neben der Neuroprotektion und der Modulation neuronaler Hyperexzitabilität stellt die entzündungshemmende Behandlung somit eine bedeutsame und hoffnungsvolle Strategie zur Modulation der Epileptogenese und der damit assoziierten Komorbiditäten dar. In den letzten Jahren konnte weiterhin gezeigt werden, dass aktivierte Mikrogliazellen maßgeblich am Entzündungsgeschehen im ZNS beteiligt sind. Der calciumabhängige Kaliumkanal KCa3.1 ist dabei in hohem Maße für die Mikrogliaaktivierung verantwortlich. Eine Hemmung dieses Kanals könnte zur Modulation der Mikrogliafunktion führen, welche einen vielversprechenden Ansatzpunkt zur Entzündungshemmung darstellt. Als selektiver Blocker konnte TRAM-34 bereits in früheren Studien Entzündungsprozesse im Gehirn verringern und somit seine neuroprotektiven Eigenschaften beweisen. Oberstes Ziel einer Therapie mit TRAM-34 wäre eine Prophylaxe der Epilepsie. Zumindest sollte jedoch eine Reduzierung des Schweregrades oder der Häufigkeit der Anfälle erreicht werden. Im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens sollten daher folgende Fragen geklärt werden:

- ✓ Welchen akuten Effekt hat die Behandlung mit TRAM-34 in einem Kindling-Modell auf die verschiedenen Anfallsparameter?
- ✓ Welchen Einfluss hat die Behandlung mit TRAM-34 auf die verschiedenen Anfallsparameter in der Phase der Epilepsieentstehung?
- ✓ Inwiefern beeinflusst die Behandlung mit TRAM-34 die Wirksamkeit des Standardantiepileptikums Phenobarbital nach wiederholten Anfällen?
- ✓ Wie wirkt sich die Behandlung mit TRAM-34 in einem etablierten SE-Modell auf die Häufigkeit, Schwere, Art und Dauer der Anfälle aus?
- ✓ Inwieweit werden verhaltensassoziierten Veränderungen sowie kognitive Defizite durch die Applikation von TRAM-34 verhindert oder verringert?
- ✓ Lassen sich in histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen Veränderungen auf zellulärer Ebene, vor allem bezüglich der Mikrogliaaktivierung und der daraus resultierenden Zytokinausschüttung feststellen?

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Modulation der Mikrogliaaktivierung in chronischen Tiermodellen

1.1. Versuchstiere

Der Versuch wurde nach Genehmigung des Vorhabens durch die Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-173-11 mit dem Titel „Charakterisierung der Epileptogenese-assoziierten Mikrogliafunktion und deren pharmakologische Modulation“ durchgeführt. Für die Untersuchung der Effekte von TRAM-34 auf die Epileptogenese und epilepsieassoziierte Verhaltensstörungen wurden weibliche Sprague Dawley-Ratten (Harlan Winkelmann, An Venray, Niederlande) verwendet. Bei ihrer Ankunft wiesen die Tiere ein Gewicht von 200-224 g auf. Sie wurden einzeln in „Makrolon Typ III hoch“ Käfigen gehalten, welche mit Weichholzgranulat (Grade 5, Altromin GmbH, Lage) eingestreut waren. Die Ratten erhielten Standardnagerdiät (Ssniff, Spezialdiäten GmbH, Soest) und Leitungswasser *ad libitum*. Futter sowie Wasser wurden jeweils einmal pro Woche erneuert. Die Tiere wurden während des Projektes einmal pro Woche in saubere Käfige umgesetzt. Dies geschah stets ein bis zwei Tage vor den Versuchen, wodurch der Stressfaktor für die Tiere unmittelbar vor den Versuchen minimiert werden konnte. Die Umgebungstemperatur im Tierstall betrug 22-24°C und die Luftfeuchtigkeit 45-60%. Um 7:00 MEZ begann der 12-stündige Hell-Dunkel-Rhythmus mit einer Helligkeitsphase, welche um 19:00 MEZ in eine Dunkelphase wechselte. Nach der Ankunft hatten die Tiere vor Versuchsbeginn zehn Tage Zeit, um sich an ihre neue Umgebung zu gewöhnen. In diesem Zeitraum wurden die Tiere an mindestens fünf Tagen mit den jeweiligen Versuchsbedingungen und dem sie betreuenden Personal vertraut gemacht. Um dem zirkadianen Rhythmus der Tiere gerecht zu werden, wurde mit den Versuchen stets zwischen 7:00 MEZ und 9:00 MEZ begonnen. Um das Wohlbefinden der Tiere sicherzustellen, wurden diese täglich einer ausführlichen Allgemeinuntersuchung anhand des modifizierten *Irwin-Scales* (IRWIN 1968) (Kap. X.3) unterzogen.

1.2. Elektrodenimplantation

Die für die Operation erforderliche Narkose wurde mit Chloralhydrat (360 mg/kg in 10 ml/kg 0,9%ige NaCl-Lösung, intraperitoneal (i.p.)) durchgeführt. Etwa 30 Minuten vor Operationsbeginn, sowie 24 Stunden (h) *post operationem* wurde den Tieren subkutan (s.c.) Meloxicam (1 mg/kg; Metacam[®] Injektionslösung, Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein) injiziert. Es erfolgte zudem eine Lokalanästhesie mit Bupivacain Jenapharm[®] 0,5% (ca. 0,8 ml; Mibe GmbH, Brehna) s.c. in das zu eröffnende Areal. Hierdurch wurde eine perioperative Analgesie gewährleistet. Um die Austrocknung der Augen zu verhindern, wurde Augensalbe (Bepanthen[®] Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) in beide Augen der Ratten eingebracht. Die ausreichende Narkosetiefe wurde anhand des Zwischenzehen- sowie des Kornealreflexes überprüft. War eine ausreichende Narkosetiefe erreicht, wurden die Tiere in einen Stereotakten (TSE Systems GmbH, Bad Homburg) eingespannt. Dieser gewährleistete die exakte Positionierung der Ableitungs- und Stimulationselektrode (bipolare Elektrode aus rostfreiem Stahl mit einer Ummantelung aus Teflon) in der rechten BLA. Um die Elektrode punktgenau implantieren zu können, wurde der stereotaktische Atlas von PAXINOS und WATSON (2005) zur Orientierung herangezogen. Darin werden die Hirnstrukturen in Bezug zu Bregma (rostraler Kreuzungspunkt der Schädelknochennähte) angegeben (Abb. 5). Für die exakte Positionierung der Elektrode müssen Bregma und Lambda (kaudaler Kreuzungspunkt der Schädelknochennähte) laut stereotaktischem Atlas auf gleicher Höhe liegen. Hierfür wurde die Oberkieferhalterung auf -3,9 mm ventral der Intraaurallinie eingestellt, so wie es für Sprague Dawley-Ratten im Atlas angegeben wird. Nach vorangegangenen Lokalisationsversuchen erfolgte die Implantation der Elektrode in die rechte BLA anteriorposterior (ap) +2,2; lateral (lat) +4,7 und dorsoventral (dv) +8,5. Zusätzlich zu den beiden Fixationsschrauben wurde gegenüber der Tiefenelektrode eine durch eine weitere Schraube an der Schädeldecke befestigte indifferente Teflon-ummantelte Erdungselektrode angebracht. Die Fixationsschrauben wurden eingesetzt, um den kaltpolymerisierenden Kunststoff Paladur[®] (Fa. Heraeus, Hanau) zu befestigen. Dieser Kunststoff diente somit zur Fixation der Elektrode.

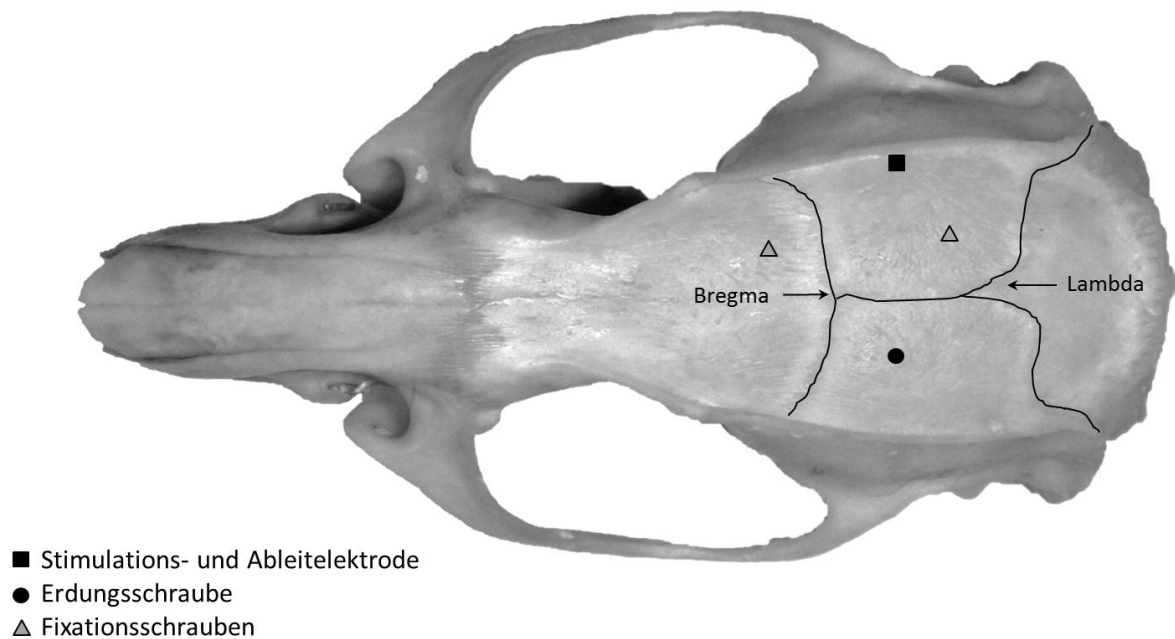


Abb. 5: Aufsicht auf einen Rattenschädel mit Lokalisation der Stimulations- und Ableitungselektrode, der Erdungsschraube sowie der Fixationsschrauben (Foto von T. Licko)

Um die Möglichkeit einer Wundinfektion auszuschließen, wurde der ersten Paladurschicht, welche dem Schädelknochen direkt anlag, 2,1%iges Gentamicinsulfat (Sigma Aldrich, München) zugesetzt. Zusätzlich wurden die Tiere über einen Zeitraum von acht Tagen zweimal täglich mit Marbofloxacin (0,1 mg/kg; s.c.; Marbocyl®, Vétoquinol, Ravensburg) antibiotisch versorgt. Hiermit wurde einen Tag prä OP begonnen. Nach erfolgreicher Implantation der Elektrode folgte eine Regenerationsphase. Diese betrug im BLA-Kindling-Modell zwei Wochen und im SE-BLA-Modell sechs Wochen. Die im SE-BLA-Modell gegenüber dem BLA-Kindling-Modell verlängerte Regenerationszeit erhöht die Sensibilität gegenüber der folgenden Dauerstimulation, wodurch ein größerer Anteil der Tiere einen generalisierten SE entwickelt. Die Tiere für das BLA-Kindling-Modell wurden von Kolleginnen operiert und von mir bereits implantiert übernommen.

1.3. Anfallsparameter

Sowohl im BLA-Kindling-Modell als auch im SE-BLA-Modell erfolgte die Einteilung der Anfallsstadien basierend auf einer Skala von Racine (RACINE 1972). Diese Skala wurde in der vorliegenden Arbeit leicht modifiziert angewendet. Hierbei werden sieben Anfallsstadien unterschieden (Tabelle 1).

Krampfschwere	Anfallscharakteristika	
Stadium I	Immobilität, schwacher Fazialklonus (stereotypes Schnüffeln, Schließen des ipsilateralen Auges)	Fokale Anfälle
Stadium II	Starker Fazialklonus (Kopfnicken, Kaubewegungen)	
Stadium III	Unilateraler Vorderextremitätenklonus	
Stadium (IV)	Bilateraler Vorderextremitätenklonus, Aufrichten des Rumpfes < 45°	Generalisierte Anfälle
Stadium IV	Bilateraler Vorderextremitätenklonus, Aufrichten des Rumpfes > 45°	
Stadium (V)	Bilateraler Vorderextremitätenklonus ohne Aufrichten, aber mit seitlichem Wegdrehen des Rumpfes oder Flexion des Halses	
Stadium V	Bilateraler Vorderextremitätenklonus, Aufrichten des Rumpfes, Verlust der Stellreflexe (Hintenüberfallen)	

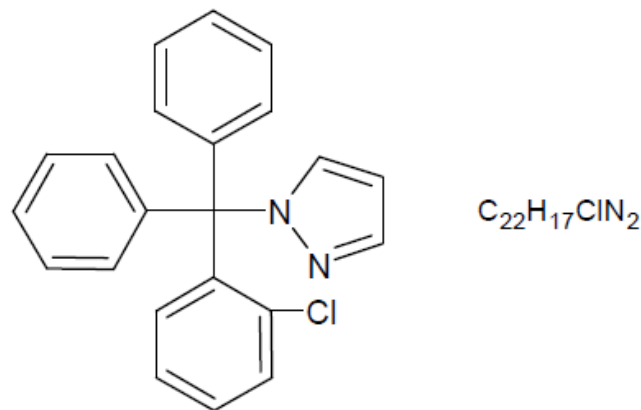
Tabelle 1: Skala der Krampfstadien im BLA-Kindling- und im SE-BLA-Modell. Modifiziert nach RACINE et al. (1972).

Nachentladungen ohne sichtbare motorische Krampfaktivität wurden für die Auswertungen mit dem Wert Null bezeichnet. Als Nachentladungen werden hierbei die als Folge der elektrischen Stimulation auftretenden Spikes im EEG bezeichnet. Eine Sonderform des Stadiums V stellt das *running and bouncing* dar. Es ist gekennzeichnet durch explosionsartig einsetzendes Rennen und Springen und weist auf eine Beteiligung weiterer Gehirnregionen hin.

Die Klassifizierung der verschiedenen SSSE-Typen erfolgte auf Grundlage dieser Einteilung. Als Typ 1 SSSE wird dabei das kontinuierliche und ausschließliche Auftreten fokaler Anfallsaktivität gewertet. Typ 2 SSSE beschreibt hingegen die Tiere, welche vorwiegend fokale Anfälle zeigen, bei denen jedoch auch einzelne generalisierte Anfälle auftreten. In Typ 3 SSSE werden Tiere eingeordnet, die kontinuierlich generalisierte Anfallsaktivität aufweisen (BRANDT et al. 2003).

1.4. Triarylmethan-34

TRAM-34 wurde von der Arbeitsgruppe Wulff der *University of California* in Davis, USA synthetisiert und stammt aus der 23. Charge. Das Molekulargewicht beträgt 344,85 g/mol. In Abb. 6 sind sowohl die Struktur-, als auch die Summenformel von TRAM-34 dargestellt.



1-[(2-chlorophenyl)(diphenyl)methyl]-1 *H*-pyrazole

Abb. 6: Struktur- und Summenformel von TRAM-34 modifiziert nach WULFF et al. (2000)

1.5. Amygdala-Kindling-Modell

Anschließend an die zweiwöchige Regenerationsphase wurde mit dem Kindling begonnen. Dazu wurden die Tiere mit einem dreipoligen, abgeschirmten, ummantelten Kabel über ihren Steckeraufsatz mit einer Stimulatoreinheit (Fa. Sachs Elektronik, Hugstetten) verbunden. Die Ableitungseinheit bestand aus einem Ein-Kanal-Verstärker (BioAmp, ADInstruments LTD., Hastings, UK), einem Analog-Digitalwandler (PowerLab 4/30, ADInstruments Ltd., Hastings, UK) und einem Personalcomputer. Dieser war mit der für die Aufzeichnung der EEGs erforderlichen Software „Chart for Windows“ (ADInstruments LTD., Hastings, UK) ausgestattet. Die Abtastrate betrug bei der Aufzeichnung 1 kS/s. Der Verstärker ermöglichte die Darstellung eines 100-fach stärkeren EEG-Signals. Der enthaltene „low pass Filter“ eliminierte Frequenzen über 5 kHz, der „high pass Filter“ alle Frequenzen unter 3 Hz. Der 50 Hz Frequenzbereich wurde mit einem Notch-Filter gefiltert. Die zwischengeschaltete *Switchbox* ermöglichte sowohl eine annähernd kontinuierliche Ableitung des EEGs, als auch eine gleichzeitige Stimulation über dieselbe Elektrode. Durch das Umschalten der Verbindung zwischen Ratte und EEG-Aufzeichnungseinheit auf die Verbindung zwischen Stimulationseinheit und Ratte,

kam es jedoch sowohl kurz vor als auch kurz nach dem Stimulus zu kurzen Unterbrechungen der EEG-Ableitung. Durch die Betätigung eines Auslösers wurde ein monophasischer Rechteckimpuls mit der Dauer von einer Millisekunde (ms) und einer Frequenz von 50 Hz für die Gesamtdauer von einer Sekunde abgegeben. Zu Beginn des Kindling-Prozesses wurde für jedes Tier individuell die initiale Nachentladungsschwelle (*afterdischarge threshold*, ADT) bestimmt. Diese gibt die Stromstärke an, welche notwendig ist, um charakteristische Nachentladungen im EEG auszulösen. In der vorliegenden Studie wurden diese als Ausschläge mit mindestens doppelt so hoher Amplitude zur Grundlinie im Basal-EEG und einer Dauer von wenigstens vier Sekunden definiert. Sichtbare motorische Veränderungen können hierbei fehlen (SATO et al. 1990). Die Stimulation wurde mit acht μA begonnen. Falls weder im EEG noch augenscheinlich ein Anfall beobachtet werden konnte, wurde jeweils eine Minute später erneut mit einer um 20 Prozent höheren Stromstärke stimuliert. Die maximale Stimulationsstärke betrug hierbei 1000 μA . An den darauf folgenden Tagen wurden die Tiere jeweils einmal täglich mit einer Stromstärke von 700 μA stimuliert. Während dieses sogenannten Kindling-Prozesses wurden folgende Parameter protokolliert:

Die Krampfschwere (*seizure severity*, SS) ist in Tabelle 1 erläutert.

Die Krampfdauer (*seizure duration*, SD) wurde in SD1 und SD2 unterteilt. SD1 gibt dabei die Dauer der gesamten fokalen und generalisierten motorischen Krampfaktivität an. SD2 beschreibt die gesamte Dauer der motorischen Krampfaktivität inklusive der postiktalen Phase bis zur Normalisierung des Verhaltens der Ratte.

Die Nachentladungsdauer (*afterdischarge duration*, ADD) bezeichnet den Zeitraum, in dem nach Auslösung des elektrischen Stromimpulses charakteristische Veränderungen im EEG auftreten. Die auftretenden *Spikes* besitzen dabei eine Frequenz von mindestens einem Hz und eine Amplitude von mindestens doppelter Höhe der Grundlinie des Basal-EEGs. Kurze Unterbrechungen des Spikemusters von unter drei Sekunden werden vernachlässigt. Die ADD wird unterteilt in ADD1 und ADD2. Die Gesamtdauer der im EEG auftretenden *Spikes* wird als ADD1 bezeichnet. In einigen Fällen kommt es zu einer Veränderung des Nachentladungsmusters im EEG. Dann wird die Zeit bis zur ersten Veränderung des Musters als ADD1 festgehalten und die Gesamtdauer der Nachentladungen als ADD2 bezeichnet.

Bei jeder Stimulation wurden die aufgeführten Parameter in einem Stimulationsbuch protokolliert. Die abgeleiteten digitalen EEGs wurden aufgezeichnet und abgespeichert. Im Verlauf des Kindling-Prozesses nahmen mit steigender Anzahl an Stimulationen sowohl die Anfallsschwere als auch die Anfallsdauer bei den Ratten zu. Ein Tier galt als vollgekindelt, wenn es zehn generalisierte Anfälle gezeigt hatte. In diesen Fällen wurden die Stimulationen mit 700 μ A beendet. Im Anschluss an den Kindling-Prozess folgte eine weitere Schwellenbestimmung (postADT). Die Bestimmung der postADT erfolgte dabei jeden zweiten Tag, bis die Schwellen nur noch geringgradig (ca. 20%) voneinander abwichen und sie somit als stabil bezeichnet werden konnten. Dies war nach jeweils fünf Schwellenbestimmungen der Fall. In Abb. 7 ist der zeitliche Verlauf des Kindling-Versuches dargestellt.

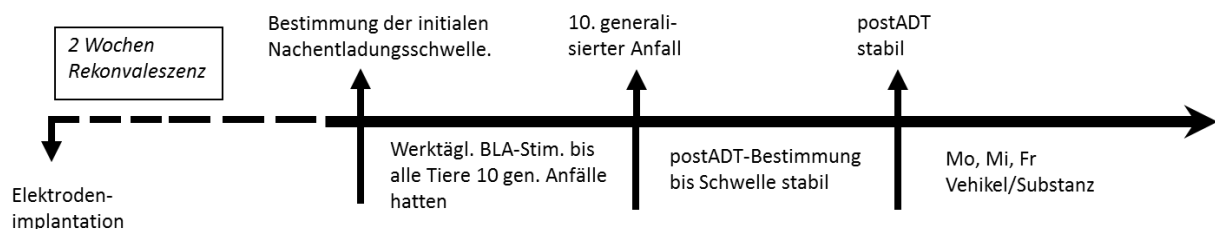


Abb. 7: Zeitlicher Ablauf BLA-Kindling-Modell

1.5.1. Substanzversuche

Sobald bei allen am Versuch teilnehmenden Tieren stabile Schwellen vorlagen, wurde mit den Substanzversuchen begonnen. Den an den Substanztests teilnehmenden Tieren wurde dabei im Abstand von zwei Tagen abwechselnd die Substanz TRAM-34 und deren Lösungsmittel Miglyol 812 injiziert. Hierbei wurden verschiedene Vorbehandlungszeiten sowie Dosierungen verwendet. Nach Applikation der Substanzen erfolgte die Schwellenbestimmung entsprechend der Bestimmung der initialen ADT (Kapitel IV.1.4). Der zeitliche Ablauf der Substanzversuche ist in Abb. 8 dargestellt.

TRAM-34 wurde eine halbe Stunde vor Versuchsbeginn bei 75°C auf dem Magnetrührer in 2 ml/kg Körpergewicht (KGW) Miglyol 812 gelöst. Die Substanz wurde den Tieren 120 min vor Bestimmung der Anfallsschwelle mit einer Dosierung von 10 bzw. 40 mg/kg KGW i.p. appliziert. Zusätzlich wurden 10 mg/kg KGW bei einer Vorbehandlungszeit von 60 Minuten getestet. Die Versuche wurden hintereinander an denselben Tieren durchgeführt. Zwei Tage vor dem jeweiligen Substanzversuch wurde ein entsprechender Vehikelversuch durchgeführt. Hierbei wurde den Tieren anstelle der Substanz das Lösungsmittel (Miglyol 812; 2 ml/kg KGW i.p.) verabreicht. Der Zeitraum zwischen den einzelnen Versuchen betrug stets zwei bis drei Tage.

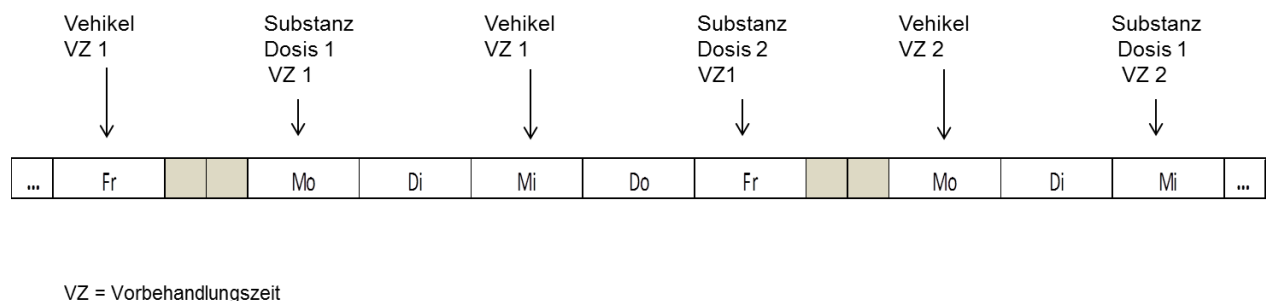


Abb. 8: Zeitlicher Ablauf der Substanzversuche

1.5.2. Massive Kindling

Nach den Substanzversuchen folgte eine weitere Ruhephase von 15 bzw. 20 Tagen. Dadurch wurde sichergestellt, dass sich zu Beginn des darauffolgenden Versuchsteils keine Rückstände der Substanz oder deren Vehikellösung im Organismus der Tiere befanden. Ein Tier musste aufgrund des Verlustes der Elektrode von allen weiteren Versuchen ausgeschlossen werden. Vor Beginn des *Massive Kindling* wurde eine weitere Schwellenbestimmung analog zur Bestimmung der initialen ADT durchgeführt (Kapitel IV.1.4). Der zeitliche Ablauf dieses Versuchsteils des Kindling-Projektes ist in Abb. 9 dargestellt. Insgesamt wurden die Tiere dabei an neun Tagen stimuliert. Der Ausdruck *Massive Kindling* wurde gewählt, da die Tiere an den jeweiligen Tagen insgesamt fünf Mal im Abstand von je einer Stunde mit einer Stromstärke von 700 μ A stimuliert wurden. Zwei Stunden vor Beginn der Stimulation wurde entweder TRAM-34 (40 mg/kg KGW; i.p.) oder Miglyol 812 (2 ml/kg; i.p.) appliziert. Nach dem vierten Tag des *Massive Kindling* erfolgte eine Ruhepause, welche drei Tage andauerte. Im Anschluss daran wurden die Tiere

weitere fünf Tage unter Anwendung desselben Applikations- und Stimulationsschemas gekindelt. Die Eintragungen im Stimulationsbuch beschränkten sich hierbei auf die Parameter SS, SD1, ADD 1 und ADD 2.

1.5.3. Applikation von Phenobarbital

Zehn Tage nach Beginn des *Massive Kindling* erfolgte eine weitere zweitägige Ruhephase. Im Anschluss daran wurde erneut eine Schwellenbestimmung analog zur Bestimmung der initialen ADT durchgeführt (Kapitel IV.1.4). Die Tiere erhielten jedoch eine Stunde vor Beginn der Schwellenbestimmung Natriumchlorid (NaCl) (10 ml/kg KGW; i.p.). Dies stellt die Vehikellösung von Phenobarbital dar. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Schwellenbestimmung im Anschluss an eine i.p.-Applikation von Phenobarbital (Phenobarbital sodium salt, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) in subtherapeutischer Dosierung (8 mg/kg KGW). Die Vorbehandlungszeit betrug dabei ebenfalls eine Stunde.

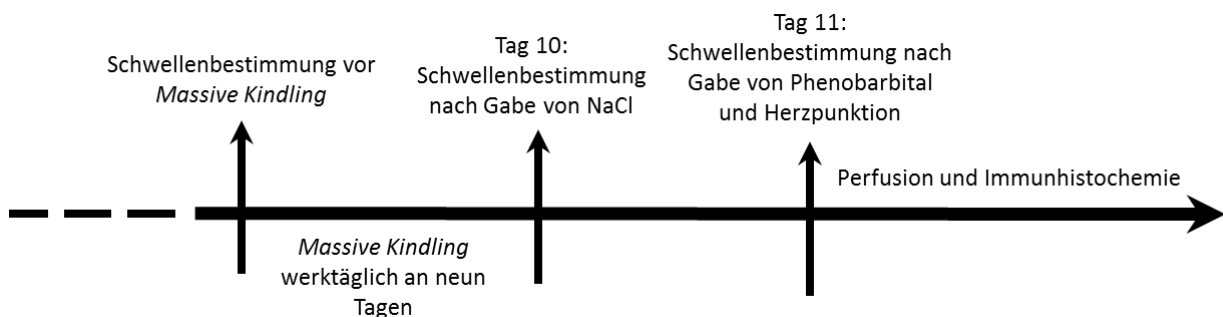


Abb. 9: Zeitlicher Ablauf *Massive Kindling*

1.5.4. Analytik

Probengewinnung

Direkt im Anschluss an den ersten generalisierten Anfall jedes Tieres bei der Schwellenbestimmung mit Phenobarbital, wurden die Tiere mit Pentobarbital (Narcoren®, 16 g/100 ml Injektionslösung für Pferd, Hund, Katze, Nerz, Iltis, Huhn, Taube, Ziervögel, Hase, Kaninchen, Meerschweinchen, Hamster, Ratte, Maus, Schlangen, Schildkröten, Eidechsen, Frösche, Pentobarbital-Natrium; MERIAL GmbH, Hallbergmoos) mit einer Dosierung von 500 mg/kg KGW i.p. euthanasiert. Anschließend wurde unter Sichtkontrolle der linke Herzventrikel zur Entnahme von Herzblut mit einer 0,9 mm Ø Kanüle punktiert. Dadurch konnte ein durchschnittliches Blutvolumen von ca. einem Milliliter gewonnen werden. Das Blut wurde in einem Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Röhrchen mit 2 ml Fassungsvermögen

(SARSTEDT AG & CO, Nürnbrecht) aufgefangen und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Die Blutproben wurden anschließend 15 Minuten lang bei 3000 *rounds per minute* (rpm) und einer Temperatur von 4°C abzentrifugiert (Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg) und das Plasma bis zur weiteren Bearbeitung in einem Tiefkühlschrank bei -20°C gelagert. Direkt im Anschluss an die Herzpunktion fand die Perfusion statt, welche nachfolgend (Kapitel IV.1.7) näher erläutert wird.

Probenaufbereitung

Die Bestimmung der Phenobarbitalkonzentration im Plasma erfolgte mittels eines Hochdruck-Flüssigkeitschromatographen (*high performance liquid chromatography*, HPLC) mit UV-Detektion durch eine technische Assistentin. Hierfür wurden 50 µl Plasma jeder Probe mit 24 µl Pentobarbitallösung (50 µg/ml Wasser), welche als interner Standard verwendet wurde, versetzt. Zusätzlich wurden 26 µl Wasser und 300 µl eiskaltes Ethanol hinzugegeben. Ethanol diente hierbei als Proteinfällungsmittel. Um die zugegebenen Substanzen mit dem Plasma zu vermischen wurde ein Reagenzglasschüttler (Mixer Uzusio, Modell VTX-3000L, LMS®, Tokyo, Japan) verwendet. Des Weiteren wurden die Proben fünf Minuten lang in einem Ultraschallbad behandelt, um die Lösung des Phenobarbitals von den Proteinen zu erleichtern. Eine vollständige Proteinfällung wurde durch eine anschließende zehnminütige Aufbewahrung im Gefrierschrank bei -20°C erreicht. Als letzter Schritt zur Lösung des Phenobarbitals von den Proteinen wurden die Proben erneut mithilfe des Reagenzglasschüttlers vermischt. Anschließend wurden die Proben 15 Minuten lang bei 4°C mit 14000 rpm zentrifugiert. Dies ermöglichte ein Absetzen der Proteine. Der verbleibende Überstand war frei von Proteinen und enthielt das zu bestimmende Phenobarbital. Der Überstand wurde anschließend im Verhältnis 1:3 mit Wasser verdünnt. Abschließend wurden die Proben erneut auf den Reagenzglasschüttler verbracht und schließlich 20 µl davon in das HPLC-System injiziert. Dieses war mit einer Säule (Eurospher 100-5 C18, 250 x 4,6 mm, Knauer, Berlin, Germany) mit integrierter Vorsäule sowie einem UV-Detektor (Smartline, 2600 Knauer, Berlin, Germany) ausgestattet. Die mobile Phase bestand aus Acetonitril und Aqua dest. im Verhältnis 40:60. Sie wurde mit einer Flussrate von einem ml/min gepumpt. Die Retentionszeit von Phenobarbital betrug unter diesen Bedingungen etwa sechs Minuten. Die Nachweisgrenze der HPLC-Methode betrug pro Injektion ein ng/20µl, die Bestimmungsgrenze betrug zwei ng/20µl. Die Menge an

Phenobarbital in den Proben wurde durch Vergleich einer Standardkurve mit drei verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Die Wiederfindungsrate betrug etwa 98%.

1.6. Post-Status-Epilepticus-Modell

Nach einer sechswöchigen Regenerationsphase wurde bei den Tieren durch eine elektrische Stimulation der BLA ein SSSE induziert. Vor Beginn der Stimulation wurde das Körpergewicht der Tiere ermittelt. Über den Steckeraufsatz wurden die Ratten anschließend mit einem zweiadrigen, abgeschirmten Kabel mit der Aufzeichnungseinheit verbunden. Dadurch war es möglich, vor der Stimulation für einige Minuten das Basal-EEG aufzuzeichnen. So konnten etwaige Normabweichungen erfasst werden. Daraufhin wurden die Tiere über dasselbe Kabel an die Stimulationseinheit (Accupulser Modell A310C und Stimulus Isolator A365, World Precision Instruments, Berlin) angeschlossen. Die darauf folgende Dauerstimulation der BLA erfolgte über einen Zeitraum von 25 Minuten. Hierbei wurden pro Sekunde zwei Einzelpulsserien von jeweils einer Sekunde Dauer mit einer Stromstärke von 700 μ A und einer Frequenz von 50 Hz erzeugt (BRANDT et al. 2003). Die Tiere wurden während der gesamten Stimulationsdauer beobachtet und die Anfallsschwere nach der in Tabelle 1 angeführten Skala bewertet. Nach 25 Minuten wurde der Reizstrom unterbrochen und die Tiere erneut an die Aufzeichnungseinheit angeschlossen. Somit konnte überprüft werden, ob sich die Tiere tatsächlich im SSSE befanden. Anschließend wurde das Kabel entfernt und die Tiere zur Beobachtung in Glas-Terrarien gesetzt. Bis zur 240. Minute *post stimulationem* wurden die Tiere kontinuierlich beobachtet und das Auftreten sowie die Schwere der Anfälle dokumentiert. Aufgrund dieser Daten wurde anschließend der SSSE-Typ bestimmt. Der SE wurde nach 240 Minuten durch eine i.p. Applikation von 10 mg/kg Diazepam (Diazepam-ratiopharm® 10mg/2ml Injektionslösung, Ratiopharm, Ulm) abgebrochen. Mithilfe früherer Studien konnte bereits belegt werden, dass eine Zeitspanne von vier Stunden im SSSE ausreichend ist, um nach einer Latenzphase von einigen Wochen spontane Anfälle zu induzieren (BRANDT et al. 2003). Falls die Tiere im Anschluss an die Diazepam-Applikation weiterhin motorische Anfallsaktivität zeigten, wurde die Injektion bei gleicher Dosierung wiederholt, bis die Anfälle dadurch komplett unterbrochen werden konnten. Um sicherzustellen, dass die Tiere sich nicht mehr im SE befanden, wurde erneut das EEG abgeleitet. Bei anhaltender charakteristischer EEG-Veränderung (mindestens drei Hz mit doppelter Amplitudenhöhe wie Ausschläge im Basal-EEG) wurde ein

weiteres Mal nachdosiert. Bis zur Wiedererlangung ihres Bewusstseins wurden die Tiere in Käfigen auf Wärmematten gelegt. Um einer Dehydratation vorzubeugen erhielten die Ratten NaCl-Injektionen (3 ml/Tier i.p. sowie 10 ml/Tier s.c.). Bis zur selbstständigen Nahrungsaufnahme wurden die Tiere in den darauffolgenden Tagen mit Babybrei gefüttert.

1.6.1. Video- und EEG-Überwachung spontaner Anfälle

Elf Wochen nach der BLA-Dauerstimulation wurde mit der Erfassung spontaner Anfälle begonnen. Deren Aufzeichnung erfolgte 14 Tage lang jeweils 24 Stunden pro Tag sowohl durch Videomonitoring, als auch durch EEG-Ableitung. Hierdurch konnte eine kontinuierliche Beobachtung der Tiere sichergestellt werden. Einzelne Tiere, die ihren Steckeraufsatz während der Überwachung verloren hatten oder bei denen es während der EEG-Ableitung zu Kabeldefekten kam, wurden ausschließlich videoüberwacht.

EEG-Aufzeichnung

Mit Hilfe des EEGs konnte der Anfallszeitpunkt eines Tieres genau bestimmt werden. Anschließend erfolgte die Klassifizierung des Anfalls anhand der Videodaten. Die EEG-Ableitungseinheit bestand aus 20 Ein-Kanal-Verstärkern (BioAmps, ADInstruments LTD., Hastings, UK), drei Analog-Digitalwandlern (PowerLab/800s, ADInstruments Ltd., Hastings, UK) und einem Personalcomputer. Dieser war mit der für die EEG-Überwachung erforderlichen Software „Chart 7 für Windows“ (ADInstruments Ltd., Australien) ausgestattet. Das System ermöglichte eine zeitgleiche Überwachung von 20 Tieren. Die Abtastrate betrug bei der Aufzeichnung 2 kS/s. Ein Verstärker ermöglichte die Darstellung eines 100-fach stärkeren EEG-Signals. Der enthaltene „low pass Filter“ eliminierte Frequenzen über 1 kHz, der „high pass Filter“ alle Frequenzen unter 0,3 Hz. Der 50 Hz Frequenzbereich wurde mit einem Notch-Filter gefiltert.

Um den Tieren während der Überwachung eine ausreichende Bewegungsfreiheit zu garantieren, wurden selbst hergestellte Kabel verwendet. Im Handel waren diese Kabel, die zudem noch eine störungsfreie Ableitung garantierten, nicht erhältlich. Es handelte sich hierbei um zweiadrige, abgeschirmte, ummantelte Kabel. Diese waren mit einem Telefonverdrehler verbunden. Mithilfe einer Krokodilklemme wurde die Kabelabschirmung am Verstärker befestigt, wodurch das Grundrauschen reduziert

werden konnte. Die aufgezeichneten EEGs wurden anschließend mit dem bereits erwähnten Computerprogramm „Chart 7“ manuell analysiert.

Video-Aufzeichnung

Die EEG-Aufzeichnungen wurden durch ein kontinuierliches Videomonitoring ergänzt. Dieses ermöglichte zum einen die Klassifizierung der Anfallstypen der im EEG detektierten Anfälle, zum anderen konnten hierdurch auch die spontanen Anfälle jener Tiere erfasst werden, die ihren Steckeraufsatz verloren hatten. Zudem konnten eventuell auftretende Störungen im EEG dadurch kompensiert werden. Für die Video-Aufzeichnung wurden drei Schwarz-Weiß-Kameras (Conrad Electronic GmbH, Hannover) sowie eine Farbkamera (Conrad Electronic GmbH, München) verwendet. Während des Nachtabschnitts des Hell-Dunkel-Zyklus ermöglichte eine eingebaute Infrarot-Technologie die Aufnahme. Zusätzlich wurden die Lichtverhältnisse durch vier Infrarotscheinwerfer (Conrad Electronic GmbH, München) verbessert. Das Datenmaterial wurde auf einer externen Festplatte (HDD, Conrad Electronic GmbH, München) gespeichert, die mit einem Computer verbunden war. Gleichzeitig erfolgte eine zusätzliche Sicherung der generierten Daten auf dem Server des Leibniz-Rechenzentrums (Leibniz-Rechenzentrum (LRZ) der Bayerischen Akademie der Wissenschaften, München).

Die zu beobachtenden Tiere befanden sich während des Zeitraums der Video- und EEG-Überwachung in transparenten Glas-Terrarien (79 x 33,5 x 33,3 cm³). Auf einer der Längsseiten der Glas-Terrarien befand sich auf einer Höhe von fünf cm ein ca. ein cm hoher Schlitz, durch den die Trinkflaschen angebracht wurden. Durch eine Trennwand wurde jedes Terrarium in zwei gleich große Kompartimente geteilt, sodass die gleichzeitige Überwachung zweier Tiere pro Terrarium ermöglicht wurde. Jede Kamera erfasste zeitgleich fünf Tiere, sodass insgesamt 20 SE-Tiere videoüberwacht werden konnten. Die Daten wurden anschließend mit der Software „DigiProtect Searcher“ (ABUS Security Center, Affing) von verblindeten Betrachtern visuell ausgewertet. Notiert wurden hierbei die Krampfschwere, -dauer und Zeitpunkt des Anfalls. Weitere sechs stimulierte Tiere sowie 18 Sham-Tiere verbrachten ebenfalls 14 Tage in Glas-Terrarien, damit für die nachfolgenden Verhaltensuntersuchungen die gleiche Behandlung aller Tiere gewährleistet werden konnte.

1.6.2. Verhaltensmodelle

Die Verhaltenstests werden im Folgenden in derselben Reihenfolge beschrieben, wie sie durchgeführt wurden. Die Detektion der Tiere und somit die Beurteilung der Verhaltensweisen, der zurückgelegten Strecke oder die Aufenthaltsdauer in verschiedenen Bereichen geschah mit Hilfe der Software „EthoVision XT 8.5“ (Noldus, Niederlande) auf einem Dell Precision Computer mit einem Intel Core 2 64-bit Mikroprozessor (T3400, Dell, Round Rock, USA). Eine Kamera (CCTV Camera, Panasonic, Suzhou, China), die über dem jeweiligen Versuchsaufbau angebracht war, ermöglichte eine Visualisierung desselben auf dem Computer. Die Tiere wurden in ihren Käfigen jeweils eine Stunde vor Versuchsbeginn im Versuchsraum platziert, um eine Akklimatisierung zu ermöglichen. Mit Ausnahme des Verhaltenstests MWM wurde die Arena nach jedem Tier mit 0,1 %iger Essigsäure gesäubert, wodurch die Duftmarken des Vorgängertieres entfernt wurden. Die Lichtintensität wurde bei jedem Versuchsaufbau mit einem Luxmeter (Light meter, MS 1300, Voltcraft®, Conrad Electronic SE, Hirschau) gemessen. Alle Apparaturen befanden sich in einem separat eingerichteten Versuchsraum auf einer Grundfläche von 2,91 x 2,94 m². Diese wurde seitlich durch schwarze Vorhänge begrenzt, welche insbesondere der Schaffung optimaler Lichtverhältnisse dienten. Zudem erfolgte hierdurch eine Schallabsorption, welche dazu diente, die Kommunikation zwischen den einzelnen Versuchstieren zu minimieren.

1.6.2.1. Open Field

Das OF bestand in diesem Versuchsaufbau aus einem halboffenen, schwarzen Kunststoffzylinder, dessen Grundfläche einen Durchmesser von 115 cm aufwies. Die Höhe der Mantelfläche betrug 25 cm. Um zwei Tiere gleichzeitig beurteilen zu können und somit die zirkadianen Unterschiede möglichst gering zu halten, wurden zwei identische OFs verwendet. Jede Arena wurde mit je einer 80 Watt Glühlampe (Spot Light Outdoor, Philips Lighting, Eindhoven, Niederlande) ausgeleuchtet. Die Lichtintensität in der Arena betrug zwischen 10 – 20 lx, sodass sie der Lichtintensität im Tierraum glich. Mit Hilfe der Software „EthoVision XT 8.5“ wurde die Arena in zwei Zonen unterteilt. Eine Zone deckte das Zentrum der Arena ab, wohingegen sich die zweite Zone entlang der Wand befand. Beide Zonen besaßen dieselbe Grundfläche. Insgesamt verbrachte jedes Tier 15 Minuten in der Arena. Die Tiere wurden dabei einzeln in etwa zehn cm Entfernung zur Wand mit Blickrichtung auf die Wand in das OF gesetzt. In diesem Versuchsaufbau wurden die zurückgelegte Strecke, die

Durchschnittsgeschwindigkeit und die Aufenthaltsdauer in der jeweiligen Zone gemessen. Zudem wurde manuell das Aufrichten der Tiere auf die Hinterbeine (*rearing*) erfasst.

1.6.2.2. Black and White Box

Die BWB bestand aus einem 38,8 x 38,8 x 39 cm³ großen weißen und einem 38,8 x 20 x 39 cm³ großen schwarzen Kompartiment. Beide Teile waren durch einen 10 x 9,8 cm² großen Durchgang miteinander verbunden. Die Wandhöhe betrug auch hier 39 cm. Die weiße Box war nach oben hin geöffnet, wohingegen der Durchgang sowie die schwarze Box durch einen schwarzen Deckel entsprechender Größe abgedeckt waren. Die Apparatur befand sich auf einem 80 cm hohen Tisch. Im weißen Bereich der BWB herrschte eine Lichtintensität von 50 lx, die durch vier über der Arena angebrachte 60 Watt Lampen erreicht wurde. Jedes Tier verbrachte fünf Minuten in der Apparatur. Die Tiere wurden einzeln in die Mitte des weißen Kompartiments gesetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Blickrichtung der Tiere immer zum Durchgang in den schwarzen Bereich zeigte. Gemessen wurde die Latenzzeit bis zum Übertritt in den schwarzen Bereich, die Aufenthaltsdauer im schwarzen sowie im weißen Kompartiment und die Anzahl der Übertritte zwischen beiden Boxen. Zudem wurde die Anzahl der *stretching postures* manuell festgehalten. Diese wurden als das Vortasten des Tieres aus dem schwarzen Bereich in den weißen Bereich definiert, welches durch eine gestreckte Körperhaltung charakterisiert ist. Hierbei befanden sich die Tiere mit den Vorderbeinen im weißen Bereich und zogen sich anschließend an die Erkundung wieder in den schwarzen Bereich zurück, ohne mit allen vier Gliedmaßen im weißen Bereich gewesen zu sein.

1.6.2.3. Elevated Plus Maze

Das EPM bestand aus einer plusförmigen Apparatur, die aus schwarzem PVC gefertigt wurde. Zwei sich jeweils gegenüberliegende offene und zwei geschlossene Arme bildeten das '+', welches sich 82 cm über dem Boden befand. Alle vier Arme besaßen jeweils eine Grundfläche von 50 x 14 cm². Die geschlossenen Arme wurden von 28,5 cm hohen Seitenwänden umgeben. Das Zentrum der Apparatur maß 14 x 14 cm². Das EPM wurde von vier 60 Watt Lampen (Konzentra, Osram, Frankreich) ausgeleuchtet, sodass eine Lichtstärke von 20 lx auf den offenen Armen und zehn lx auf den geschlossenen Armen erreicht wurde. Durch das Computerprogramm „EthoVision XT 8.5“ konnte die Apparatur in verschiedene Zonen unterteilt werden.

Dabei wurden die beiden geschlossenen sowie die beiden offenen Arme separat markiert. Weiterhin wurde eine separate Zone für das hintere Drittel der offenen Arme festgelegt. Die Tiere wurden einzeln mit Blickrichtung zum selben offenen Arm in das Zentrum der Apparatur gesetzt. Jedes Tier verbrachte fünf Minuten in diesem Versuchsaufbau. Gemessen wurden die zurückgelegte Strecke der Tiere, die mittlere Geschwindigkeit sowie die Dauer des Aufenthaltes in den einzelnen Zonen. Zusätzlich wurde die Häufigkeit des *stretching posture* (=Heraustreten mit den Vorderbeinen aus einem geschlossenen in einen offenen Arm bei gestreckter Körperhaltung und anschließendes Zurückziehen) und der *head dips* (=Herabschauen eines Tieres von den offenen Armen) manuell gezählt.

1.6.2.4. Morris Water Maze

Das Becken für diesen Versuch bestand aus einem schwarzen, halboffenen Zylinder, welcher aus Polyäthylen gefertigt war. Die Grundfläche besaß einen Durchmesser von 145 cm und die Mantelfläche wies eine Höhe von 60 cm auf. Das Becken wurde solange mit 19-21°C warmem Wasser gefüllt, bis das Wasser die eingesetzte schwarze Plattform um zwei Zentimeter überragte. Diese 15 x 10 cm² große Plattform wurde 26 cm über dem Beckenboden angebracht. Nach jedem Tier wurden eventuell abgesetzte Fäkalien aus dem Wasser entfernt. Jeden zweiten Tag wurde das Wasser ausgetauscht. Um den Tieren die Orientierung im MWM zu erleichtern, wurden an den Außenwänden für die Tiere gut sichtbare Symbole über dem Beckenrand angebracht. Bei den Hinweisen handelte es sich um ein schwarz-weiß gestreiftes Rechteck (29,6 x 28,6 cm²), ein gleichschenkliges Dreieck (Länge Basis 42 cm, Höhe Dreieck 21 cm) und einen Kreis (Ø 27,5) aus weißem Papier. Das MWM wurde von vier 60 Watt Lampen (Konzentra, Osram, Frankreich) und acht 50 Watt Halogen Kaltlichtreflektoren (Ø 50 mm, Karat, Kleve) beleuchtet. Die Lampen wurden so eingestellt, dass die Beleuchtungsstärke über dem Wasserspiegel 60 lx betrug. Mit Hilfe des Computerprogramms „EthoVision XT 8.5“ wurde das Becken in vier gleichgroße Quadranten unterteilt. In Quadrant Nummer drei wurde die Position der Plattform markiert.

Am ersten Tag des Versuches (= Tag 0) fand die Habituation der Tiere statt. Hierfür wurden die Tiere nacheinander einzeln in das Becken eingesetzt. Das Platzieren der Tiere erfolgte in jedem Quadranten jeweils in dessen gedachtem Mittelpunkt mit Blickrichtung des Tieres zur Beckenwand. Ein Durchgang dauerte 60 Sekunden. Die Plattform befand sich während der Habituationsphase nicht im Becken. Die

Habituation diene dazu, den Tieren ein Kennenlernen mit dem Versuchsablauf zu ermöglichen sowie die initiale Schwimmgeschwindigkeit der Tiere zu ermitteln.

An die Habituationsphase schloss sich in den folgenden Tagen die sechstägige Akquisitionsphase an (= Tag 1-6). Die Plattform wurde hierfür in den dritten Quadranten eingesetzt. Es war nun Aufgabe der Tiere, die Plattform innerhalb von 60 Sekunden zu finden. Auch hierfür wurden die Tiere nacheinander in jeden Quadranten platziert. Blieben die Tiere für mindestens fünf Sekunden auf der Plattform sitzen, war der Durchgang beendet. Schafften die Tiere es innerhalb der vorgegebenen Zeit jedoch nicht, die Plattform zu finden, wurden sie auf die Plattform gesetzt und verblieben dort für circa zehn Sekunden. Als Parameter für das Lernverhalten der Tiere wurden in diesem Versuch die zurückgelegte Strecke, die Schwimmgeschwindigkeit sowie die Aufenthaltsdauer in den einzelnen Quadranten erfasst. Zudem wurde die Latenzzeit bis zum ersten Erreichen der Plattform berechnet.

Direkt im Anschluss an den letzten Akquisitionsdurchgang fand die *spatial probe* (Extinktionsdurchgang) statt. Die Durchführung der *spatial probe* erfolgte nach demselben Schema wie die Akquisitionsphase. Der einzige Unterschied bestand darin, dass die Plattform aus dem dritten Quadranten entfernt wurde. Hierdurch wurde das Erinnerungsvermögen der Tiere an die in der Akquisitionsphase erworbenen räumlichen Inhalte getestet. In diesem Durchgang wurden die Latenzzeit bis zum Erreichen der ehemaligen Plattformposition, die Dauer des Aufenthaltes auf der ehemaligen Plattformposition, die Häufigkeit deren Kreuzung, die Schwimmgeschwindigkeit und die zurückgelegte Strecke, sowie die Aufenthaltsdauer in den verschiedenen Quadranten gemessen.

Die Tiere wurden nach jedem Durchgang mit einem Handtuch abgetrocknet und anschließend unter eine Rotlicht-Wärmelampe (150 Watt, Eurofarm GmbH, Bützberg, Schweiz) gesetzt.

1.7. Histologische Gewebeaufbereitung

Perfusion

Die transkardiale Perfusion mit Paraformaldehyd (PFA) diene zur Fixation des Gehirngewebes. Hierbei wurden die Gefäße des Körpers verwendet, um eine schnelle Verteilung des PFA in alle Gewebe zu gewährleisten. Die Tiere wurden hierfür mit Pentobarbital (Narcoren®, 16 g/100 ml Injektionslösung für Pferd, Hund, Katze, Nerz, Iltis, Huhn, Taube, Ziervogel, Hase, Kaninchen, Meerschweinchen,

Hamster, Ratte, Maus, Schlangen, Schildkröten, Eidechsen, Frösche, Pentobarbital-Natrium; MERIAL GmbH, Hallbergmoos) bei einer Dosierung von 500 mg/kg KGW i.p. euthanasiert. Bei der Perfusion wurde eine Knopfkanüle von der Spitze des linken Ventrikels aus in die Aorta geschoben und das rechte Herzohr mit einem Scherenschlag eröffnet. Dies ermöglichte den Abfluss des Blutes und der Perfusionslösung. Vor Verwendung des eigentlichen Fixans wurde der Blutkreislauf mit einer 0,01 M phosphatgepufferten Kochsalzlösung (pH-Wert 7,6) gespült. Bei dem Fixans handelte es sich um ein 4°C kaltes 1:1 Gemisch aus 8%igem PFA in 0,2 M Phosphatpuffer (pH-Wert 7,6). Der Blutkreislauf der Tiere wurde 20 Minuten lang mit dem Fixans gespült. Anschließend wurden die Gehirne entnommen. Diese wurden für weitere 24 Stunden in derselben Fixationslösung bei 4°C eingelegt. Um vor dem Einfrieren einen ausreichenden Gefrierschutz zu gewährleisten, wurden die Gehirne nach Ablauf der 24 Stunden in eine 30%ige Saccharose-Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer überführt und darin bei 4°C für mindestens drei Tage gelagert. Diese Technik fand sowohl im BLA-Kindling-, als auch im SE-BLA-Modell Anwendung. Die Protokolle zur Herstellung der Lösungen finden sich im Anhang (Kapitel X.2).

Herstellung der Gefrierschnitte

Die coronalen Gehirnschnitte wurden durch eine technische Assistentin mithilfe eines Schlittenmikrotoms (Modell 1205, Reichert-Jung, Wetzlar) hergestellt, an dem eine Kühlvorrichtung (Frigomobil, Fa. Reichert-Jung, Wetzlar) angebracht war. Das perfusionsfixierte Gehirn wurde mittels eines Einbettmediums (Jung, Tissue Freezing Medium®, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch) auf dem Blockträger des Mikrotoms fixiert. Zum Schneiden wurde ein 16 cm langes Stahlmesser (Leica Microsystems, Wetzlar) mit C-Schliff verwendet. Die Schnittdicke betrug 40 µm. Es wurden jeweils sechs Serien angefertigt, sodass die einzelnen Schnitte einer Serie voneinander einen Abstand von 240 µm aufwiesen. Der geschnittene Bereich befand sich etwa zwischen 0,60 mm und -6,00 mm relativ zu Bregma. Die Gehirne wurden während des Schneidens auf -30°C gekühlt. Die Schnitte wurden in 0,1 M-Phosphatpuffer aufgefangen und anschließend in Gefriermedium überführt. Es folgte eine 24-stündige Lagerung bei -20°C, bevor die Schnittserien bis zur weiteren Verarbeitung in einen Gefrierschrank mit -80°C überführt wurden.

1.8. Histochemische und immunhistochemische Färbemethoden

Durch verschiedene histochemische und immunhistochemische Färbungen können anfallsinduzierte neuronale Veränderungen dargestellt werden. Hierzu zählen sowohl neurodegenerative und inflammatorische Prozesse, als auch die Neubildung von Neuronen. Für die Untersuchung anfallsinduzierter Veränderungen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene Gehirnregionen betrachtet. Falls nicht anders vermerkt, wurden die Färbungen sowohl an Gehirnschnitten von Tieren des BLA-Kindling-Modelles, als auch an Schnitten von Tieren des Post-SE-Modelles durchgeführt.

1.8.1. Nissl-Färbung

Zusätzlich zu den immunhistochemischen Färbungen wurde die erste Serie der Gehirnschnitte jedes Tieres mit der Nissl-Methode gefärbt. Als Farbstoff diente hierbei Thionin. Das Prinzip dieser Färbung beruht auf einer Anlagerung des kationischen, basischen Farbstoffes an den anionischen, sauren Molekülen des Gewebes. Diese liegen in großer Zahl in den Phosphatresten vor, welche im Gehirn vor allem in der Desoxyribonukleinsäure (DNS) der Zellkerne der Neuronen und im mit Ribosomen besetzten, rauen endoplasmatischen Retikulum (rER; Nissl-Schollen) vorkommen. Somit eignet sich diese Methode besonders zur Darstellung der Somata der Neuronen. Gliazellen besitzen keine Nissl-Schollen, sodass eine klare Differenzierung von Neuronen und Gliazellen ermöglicht wird. Die Nissl-Färbung diente somit der Beurteilung der Neurodegeneration sowie der Verifizierung der korrekten Lokalisation der implantierten Elektroden.

1.8.2. Immunhistochemische Nachweismethoden

Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf der Spezifität von Antikörpern, mithilfe derer sich bestimmte Antigene am histologischen Schnitt sichtbar machen lassen. Es werden hierbei gezielt Antigene ausgewählt, die lediglich in bestimmten Zelltypen oder Geweben auftreten.

Färbeprotokoll TNF- α und ED1

Alle immunhistochemischen Färbungen wurden im „*free floating*“-Verfahren durchgeführt. Die 40 μ m dicken Gehirnschnitte wurden hierfür dreimal für je fünf Minuten sorgfältig in 0,05 M Tris-gepufferter NaCl-Lösung (TBS; pH-Wert 7,6)

gewaschen. Um eine Beeinträchtigung der Immunreaktivität des PFA-fixierten Gewebes zu verhindern, wurde anschließend eine Antigen-Demaskierung durchgeführt. Hierzu wurden die Schnitte für 30 Minuten bei 80°C in Natriumcitrat-Puffer (pH-Wert 9,0) verbracht. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBS für jeweils fünf Minuten, wurde durch H_2O_2 die endogene Peroxidaseaktivität zerstört. Die Schnitte wurden dazu für 60 Minuten in 0,5%iges H_2O_2 verbracht. Es folgte ein weiterer Waschschrift in TBS (dreimal für je fünf Minuten). Um unspezifische Reaktionen der Antikörper zu verhindern, wurden die Gehirnschnitte im Anschluss daran für 60 Minuten in einer Blocklösung (TBS, 2% bovines Serumalbumin, 0,3% Triton X-100, 5% Serum der Tierart, aus welcher der sekundäre Antikörper stammt) inkubiert. Anschließend erfolgte eine ca. zwölfstündige Inkubation der Gehirnschnitte bei 4°C im primären Antiserum. Am nächsten Tag fand eine Spülung der Gehirnschnitte mit TBS (dreimal für je zehn Minuten) statt. Anschließend wurden die Gehirnschnitte für 60 Minuten in dem Biotin-markierten sekundären Antiserum inkubiert. Darauf folgte ein erneuter Waschschrift mit TBS (dreimal für je fünf Minuten), um die ungebundenen sekundären Antikörper zu entfernen. Der letzte Schritt bestand aus einer 60-minütigen Inkubation mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (1:1400, Jackson Immunoresearch, Westgrove, USA). Abschließend erfolgte ein letzter Waschschrift mit TBS (dreimal für je fünf Minuten). Die Antikörperkonjugate wurden anschließend mittels einer schwermetallverstärkten 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Reaktion sichtbar gemacht. Die Gehirnschnitte wurden zu diesem Zweck in eine DAB-Reaktionslösung überführt (pro Gehirn 4 ml Tris/Ni-Lösung, 1 mg in 100 μl Aqua dest. gelöstes DAB-Tetrahydrochlorid und 1 μl 30%iges H_2O_2). Schließlich wurden die Gehirnschnitte mithilfe von Chromgelatine in anterior-posteriorer Reihenfolge auf Objektträger aufgezogen, getrocknet, dehydriert und mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckt. Die primären und sekundären Antikörper, die im Rahmen dieser Arbeit Verwendung fanden, sind in Tabelle 2 dargestellt.

Färbeprotokoll BrdU/NeuN

Die Bromdesoxyuridin (BrdU)/NeuN-Färbung wurde lediglich bei Tieren des Post-SE-Projektes durchgeführt, da nur diese Tiere während des *in-vivo*-Versuches BrdU injiziert bekommen hatten. Entsprechend dem zuvor bereits beschriebenen Färbeprotokoll wurde auch diese Färbung mit einem Waschschrift begonnen. Anschließend wurden die Gehirnschnitte für zwei Stunden bei 65°C in

Formamid/Standard-Salz-Citrat (SSC)-Lösung inkubiert. Dieser Schritt diente der Denaturierung der DNS, wodurch einzelsträngige DNS entstand. Formamid erhöht hierbei die Stabilität der Einzelstrang-DNS. Bei BrdU handelt es sich um ein Thymidinanalogon, welches in der S-Phase des Zellzyklus anstelle von Thymidin in die DNS eingebaut wird. Die DNS-Denaturierung ermöglicht es dem später verwendeten Anti-BrdU-Antikörper, in der Einzelstrang-DNS an BrdU zu binden. Nachdem die Gehirnschnitte auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden sie in zweifaches SSC verbracht und darin zehn Minuten lang gewaschen. Daraufhin erfolgte ein weiterer Denaturierungsschritt durch eine 30-minütige Inkubation in 2 N Salzsäure (HCl) bei 37°C. Im Anschluss daran wurden die Schnitte zweimal für fünf

primäre Antikörper	Hersteller	Konzentration	sekundäre Antikörper	Hersteller	Konzentration
polyklonaler Kaninchen-anti-TNF-alpha	Abcam, Cambridge, UK	1:200	polyklonaler biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen	Dako, Glostrup, Dänemark	1:500
monoklonaler Ratte-anti-BrdU	AbD Serotec, Kidlington, UK	1:30	Cy3-konjugierter Esel-anti-Ratte	Jackson Immuno Research, Westgrove, USA	1:1000
monoklonaler Maus-anti-NeuN	Merck Millipore, Billerica, USA	1:500	polyklonaler biotinylierter Esel-anti-Maus	Jackson Immuno Research, Westgrove, USA	1:500
monoklonaler Maus-anti-Cd68	AbD Serotec, Kidlington, UK	1:300	polyklonaler biotinylierter Kaninchen-anti-Maus	Dako, Glostrup, Dänemark	1:500

Tabelle 2: Überblick über die bei den immunhistochemischen Färbungen verwendeten primären und sekundären Antikörper

Minuten in 0,1 M Borsäure (pH 8,5) gewaschen, um das zuvor verwendete HCl zu neutralisieren. Daran schloss sich ein Waschschrift in TBS an. Die Schnitte wurden anschließend für 60 Minuten in Blocklösung verbracht, um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren und danach in das primäre Antiserum überführt. Hierin verblieben sie bei 4°C für ca. zwölf Stunden. Am Folgetag wurden die Gehirnschnitte erneut gewaschen (dreimal für je zehn Minuten). Ab diesem Schritt mussten alle darauffolgenden Schritte im Dunkeln durchgeführt werden. Die Schnitte wurden für 60 Minuten im sekundären Antiserum inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte eine einstündige Inkubation mit Streptavidin Cy2 (Jackson ImmunoResearch, Westgrove, USA). Abschließend wurden die Schnitte erneut mit TBS gewaschen. Die Sichtbarmachung der Antikörperkonjugate erfolgte in diesem Färbeprotokoll mittels fluoreszierender Farbstoffe. Die Schnitte wurden anschließend analog zu dem oben beschriebenen Färbeprotokoll auf Objektträger aufgezogen und eingedeckt. Die für diese Färbung verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 2 angegeben.

1.9. Auswertung und Statistik

Alle histologischen und immunhistochemischen Auswertungen wurden verblindet durchgeführt. Die für die Auswertung herangezogenen Schnittebenen wurden nach (PAXINOS u. WATSON 2005) definiert.

Score-System der Neurodegeneration und Mikrogliaaktivierung

Neurodegenerative Veränderungen im Bereich der CA-Region des Hippocampus wurden semiquantitativ mittels eines Score-Systems erfasst, welches in ähnlicher Form von der finnischen Arbeitsgruppe um Halonen (HALONEN et al. 2001) verwendet wurde. Hierbei wurden die CA₁-, CA₂-, CA_{3a}- und CA_{3c/4}-Region, sowie der parietale und der piriforme Cortex von zwei unabhängigen, verblindeten Beobachtern getrennt voneinander betrachtet und schließlich der Mittelwert der erzielten Scores gebildet. Zur Beurteilung der Mikrogliaaktivierung wurden die CA₁-, CA₂-, CA_{3a}- und CA_{3c/4}-Region, sowie der GD und der Hilus des Hippocampus herangezogen. In Tabelle 3 ist das hierbei verwendete Score-System dargestellt. Für die Auswertungen wurde der jeweils höchste erzielte Wert pro Tier für die Berechnung des Gruppenmittelwertes der jeweiligen Region berücksichtigt.

Score	Neurodegeneration	Auftreten von Mikroglia
0	keine offensichtlichen Läsionen	kein offensichtliches Auftreten von Mikroglia
1	eventuelles Auftreten von Läsionen (<20% der Neuronen)	schwache Mikrogliaaktivierung
2	offensichtliche Läsionen mit Einbezug von 20-50% der Neuronen	mäßige Mikrogliaaktivierung
3	offensichtliche Läsionen mit Einbezug von >50% der Neuronen	starke Mikrogliaaktivierung

Tabelle 3: Score-System für die Bewertung der Neurodegeneration und Mikrogliaaktivierung

Quantifizierung von TNF- α und ED1 im Hilus mit der „optical fractionator“ Methode

Mit Hilfe der computergestützten Bildanalysesoftware „Stereo-Investigator 6.0“ (Microbright Europe, Magdeburg) erfolgte eine Quantifizierung des Zytokins TNF- α sowie des mikroglialen Markers ED1 im Hilus des Hippocampus. Dabei wurde der Hilus des Hippocampus als Areal zwischen der inneren Grenze der Körnerzellschicht und zweier Verbindungslinien, die das distale Ende der Körnerzellschicht mit dem proximalen Ende der CA_{3c/4}-Region verbinden (GORTER et al. 2001), definiert. Das System bestand aus einer optischen Einheit und einem datenverarbeitenden Computersystem (AMD Athlon™ Computer mit einem 64-er Rechenprozessor). Die optische Einheit setzte sich aus einem Leica DMLB-Mikroskop (Leica, Bensheim) mit einer Plan-Neofluar Linse (Leica, Bensheim) und einer digitalen Farbkamera (*single chip charge coupled device*, CCD, CX9000, Microbrightfield Europe, Magdeburg) zusammen. Die Quantifizierung von TNF- α sowie ED1-positiver Zellen erfolgte stereologisch anhand der „optical fractionator“ Methode (WEST et al. 1991). Dabei ermöglicht die Stereologie die Ermittlung numerischer Daten über eine dreidimensionale geometrische Struktur. Die Abschätzung der absoluten Anzahl an sezerniertem TNF- α sowie Mikrogliazellen in verschiedenen Hirnarealen wird somit möglich. Das Ergebnis ist hierbei unabhängig von Gehirnform, Orientierung, Gehirngröße oder einer eventuellen Schwellung sowie Schrumpfung des Gewebes. Die Zählung erfolgt über das Oberflächenareal, das Volumen, die Anzahl der in diesem Raum befindlichen Zellen und über die Länge der zweidimensional geschnittenen Ebenen (STERIO 1984; GUNDERSEN et al. 1988). Das Prinzip der „optical fractionator“ Methode basiert darauf, dass bestimmte Probenbereiche aus

der Gesamtheit der Zellen zufällig ausgewählt und daraufhin exemplarisch gezählt werden. Anschließend erfolgt eine Hochrechnung des gezählten Ergebnisses auf das gesamte Areal. Durch das Zählen einer dreidimensionalen Probe wird zudem eine Aussage über die Zellzahl pro Volumeneinheit ermöglicht. Die nach festgelegten Regeln quantifizierte dreidimensionale Probe wird als „*optical disector*“ (Abb. 10) bezeichnet. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des effizienten und optimierten „*optical fractionator*“ Zählschemas (WEST et al. 1991). Pro Hemisphäre jedes Tieres wurden jeweils sechs Schnitte mit gleichmäßigen Abständen ausgezählt. Dies diente dazu, ein möglichst großes Areal des relevanten Hirngebietes für die Quantifizierung von TNF- α und ED1 miteinzubeziehen. Die Quantifizierung von ED1 erfolgte in der vorliegenden Arbeit stichprobenartig an jeweils fünf randomisiert ausgewählten Tieren einer Gruppe des BLA-Kindling-Projektes.

Quantifizierung der BrdU/NeuN-positiven Zellen

Die Anzahl der doppelmarkierten, fluoreszierenden BrdU/NeuN-positiven Zellen wurde durch eine technische Assistentin mit einem konfokalen Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss GmbH, Göttingen) erfasst, welches das emittierte Fluoreszenzsignal der Zellen detektierte. Dabei wurden von jedem Tier jeweils sechs Schnitte pro Hemisphäre ausgewertet. Die Anzahl der Zellen wurde in der gesamten Körnerzellschicht des GD, sowie im Hilus des Hippocampus bei 40-facher Vergrößerung bestimmt. Der Hilus wurde dabei als das Areal zwischen der inneren Grenze der Körnerzellschicht und zwei Verbindungslinien, welche das proximale Ende der CA_{3c/4}-Region mit dem distalen Ende der Körnerzellschicht verbinden (GORTER et al. 2001), definiert.

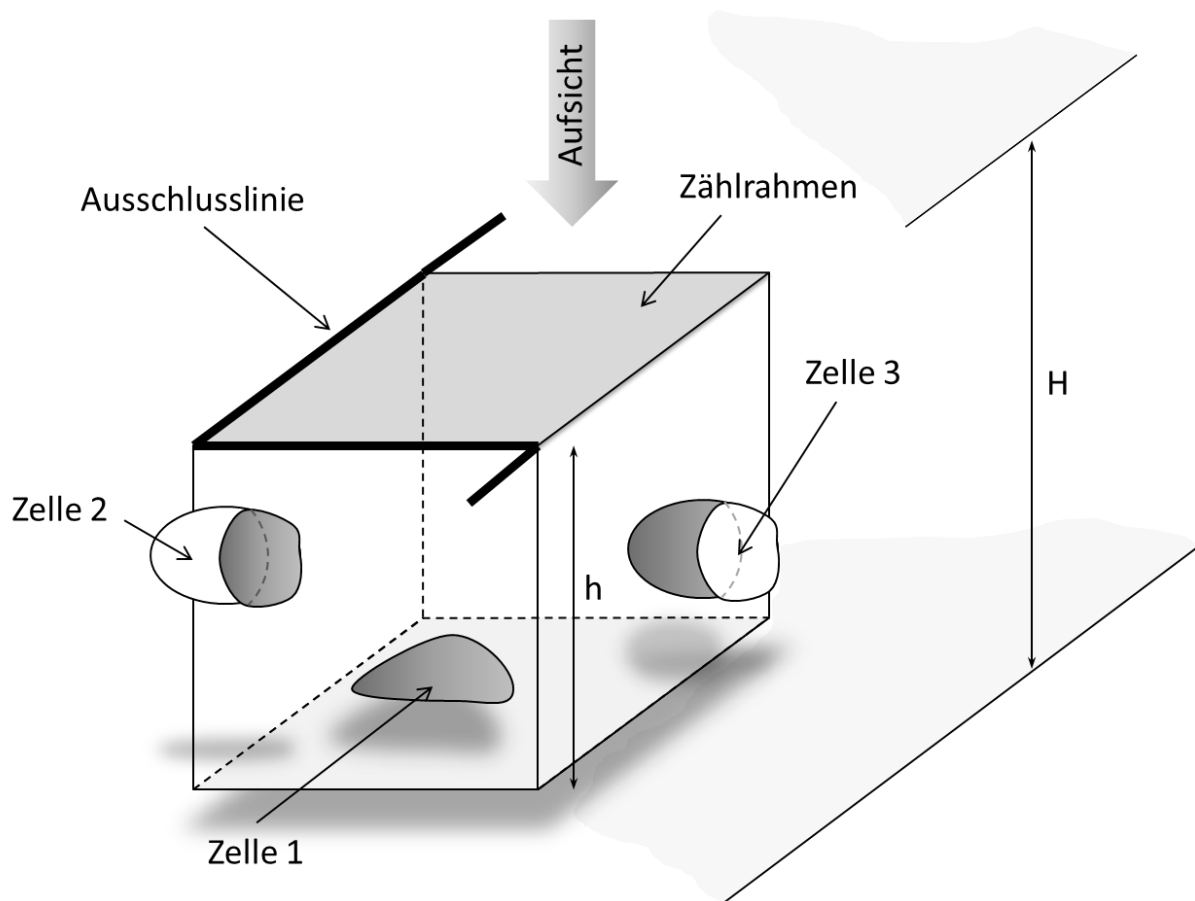


Abb. 10: Schema eines *optical disectors*. Der *optical disector* der Höhe h befindet sich in einem Präparat der Höhe H . Hierdurch kann die unregelmäßige Oberfläche des Präparates vernachlässigt werden. Die Zählgrenze des quadratischen Zählrahmens wird durch die dunkle Ausschlusslinie markiert. Alle Zellen, die diese Ausschlusslinie berühren, werden nicht mitgezählt. Für die hier schematisch dargestellten Zellen bedeutet dies: Zelle 1 liegt vollständig im Zählrahmen und wird somit gezählt; Zelle 2 berührt die Ausschlusslinie und wird somit nicht mitgezählt; Zelle 3 liegt nur teilweise im Zählrahmen, berührt die Ausschlusslinie jedoch nicht. Sie wird daher mitgezählt. Modifiziert nach KEUKER et al. (2001).

Statistik

Alle statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm „GraphPad Prism 5“ für Windows durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM (*standard error of the mean*, Standardfehler) angegeben. Das Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$. Die statistische Signifikanz der Anfallsdaten aus dem Substanzversuch des BLA-Kindling-Modelles wurde mit dem t-Test für verbundene Stichproben (*paired t-test*) berechnet. Die Analyse verbundener Daten eines Score-Systems erfolgte hierbei mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (*Wilcoxon matched-pairs signed rank test*). Bei Vorliegen parametrischer Daten, wurde für den Vergleich zweier Gruppen der ungepaarte t-Test angewendet. Bei nicht parametrischen unverbundenen Daten,

wurde der Mann-Whitney U-Test angewendet. Die einfaktorielle Varianzanalyse (*one-way* ANOVA) wurde für den Vergleich parametrischer Daten von mehr als zwei Gruppen angewendet. Bei Vorliegen nicht parametrischer Daten wurde die statistische Signifikanz mit der Kruskal-Wallis-Varianzanalyse errechnet.

1.10. Versuchsdesign

BLA-Kindling-Modell

Die Implantation einer Stimulations- und Ableitungselektrode in die rechte BLA erfolgte an 45 weiblichen Sprague Dawley-Ratten (Kapitel IV 1.2). Um das Kindling-Modell zu generieren, wurden 25 dieser Ratten so lange gekindelt, bis sie zehn generalisierte Anfälle gezeigt hatten. Zudem dienten zehn Ratten als Kontrolltiere. Aufgrund eines Implantatverlustes mussten zehn Ratten vorzeitig euthanasiert werden. Die Kontrolltiere wurden analog zu den Kindling-Tieren behandelt, jedoch nicht stimuliert. Hatten die Tiere ihren zehnten generalisierten Anfall gezeigt, wurde im Abstand von zwei Tagen so lange die postADT bestimmt, bis diese stabil war. Dies war bei allen Tieren nach fünfmaliger Schwellenbestimmung der Fall. Ein Tier musste aufgrund eines Implantatverlustes von allen weiteren Versuchen ausgeschlossen werden. Für die sich anschließenden Substanzversuche (siehe hierfür Abb. 8 in Kapitel IV 1.5.1) wurden lediglich Tiere verwendet, welchen im zweiten Teil dieses Projektes, dem *Massive* Kindling, die Substanz injiziert wurde (n=13). Den an den Substanztests teilnehmenden Tieren wurde im Abstand von zwei oder drei Tagen abwechselnd die Substanz TRAM-34 und deren Lösungsmittel injiziert. Die Vorbehandlungszeiten und Dosierungen, welche hierbei verwendet wurden, sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Nach Applikation der jeweiligen Substanzen erfolgte eine Schwellenbestimmung entsprechend der Bestimmung der initialen ADT. Aufgrund des Verdachtes auf eine bestehende Enzephalitis musste ein Tier von allen weiteren Versuchen ausgeschlossen werden. Ein Tier aus der Kontrollgruppe musste aufgrund eines Implantatverlustes von allen weiteren Versuchen ausgeschlossen werden.

Anschließend an den Substanzversuch wurde der zweite Teil des Kindling-Projektes durchgeführt. Eine Übersicht über diesen Teil des Projektes ist in Kapitel IV.1.5.2 in Abb. 9 zu finden. Vor Beginn des *Massive* Kindlings wurde erneut eine Schwellenbestimmung durchgeführt. Für das *Massive* Kindling wurden die Tiere in

Vorbehandlungszeit in min	Dosierung Vehikel (=Miglyol 812) in ml/kg KGW	Dosierung TRAM-34 in mg/kg KGW
120	2	40
120	2	10
60	2	10

Tabelle 4: Vorbehandlungszeiten und Dosierungen im Substanzversuch

drei Gruppen unterteilt. Dabei bestand sowohl die Kindling/TRAM-34-Gruppe, als auch die Kindling/Vehikel-Gruppe aus jeweils elf Tieren. Die Kontrollgruppe umfasste neun Tiere. Während des *Massive* Kindlings verloren zwei Tiere, eines aus der Kindling/Vehikel- und eines aus der Kindling/TRAM-34-Gruppe, ihr Implantat, sodass diese von allen weiteren Versuchen ausgeschlossen werden mussten. Die Tiere erhielten zwei Stunden vor Beginn des *Massive* Kindling eine i.p. Injektion von TRAM-34 (40 mg/kg KGW) bzw. dessen Vehikellösung (2 ml/kg KGW). Anschließend erfolgte im Abstand von jeweils einer Stunde eine fünfmalige Stimulation der Tiere mit einer Stromstärke von 700 μ A. Die Kontrollgruppe (n=9) erhielt dieselbe Behandlung wie die Kindling/Vehikel-Gruppe, allerdings entfiel in dieser Tiergruppe die Stimulation der BLA. An Tag 10 erfolgte 60 Minuten nach Injektion von NaCl (10 ml/kg KGW i.p.), welches die Vehikellösung von Phenobarbital darstellt, eine weitere Schwellenbestimmung. Aufgrund eines Implantatverlustes musste ein weiteres Tier aus der Kindling/TRAM-34-Gruppe von allen weiteren Versuchen ausgeschlossen werden. An Tag 11 erfolgte 60 Minuten nach Injektion einer subtherapeutischen Dosis von Phenobarbital (8 mg/kg KGW i.p.) eine abschließende Schwellenbestimmung. Direkt im Anschluss daran wurde zur Bestimmung der Phenobarbitalkonzentration im Blut der Tiere eine Herzpunktion durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere für die folgenden immunhistochemischen Untersuchungen perfundiert.

Post-Status-Epilepticus-Modell

Die Implantation einer Stimulations- und Ableitungselektrode in die rechte BLA (Kapitel IV.1.2) erfolgte an 62 weiblichen Sprague Dawley-Ratten. Vor der anschließenden elektrischen Stimulation der BLA verloren 14 Tiere ihr Implantat, sodass diese von allen weiteren Versuchen ausgeschlossen werden mussten. Die verbleibenden Tiere wurden in vier Gruppen eingeteilt. Im Anschluss erfolgte an

Ratten der Gruppe 1 (n=15) und Gruppe 3 (n=15) die 25-minütige elektrische Stimulation der BLA. Gruppe 2 (n=9) und Gruppe 4 (n=9) dienten als Kontrollgruppen. Sie wurden mit Ausnahme der Dauerstimulation analog behandelt. Direkt im Anschluss an die Diazepam-Applikation erfolgte die erste i.p. Injektion (Tag 0) der Substanz bzw. deren Vehikellösung. Gruppe 1 und 2 erhielten die Substanz TRAM-34 (40 mg/kg KGW), Gruppe 3 und 4 entsprechend die Vehikellösung Miglyol 812 (2 ml/kg KGW). Der Applikationszeitraum erstreckte sich über insgesamt 28 Tage. Mit Ausnahme der ersten drei Tage erfolgte die Injektion einmal täglich. An Tag 0 bis Tag 2 wurde diese zweimal täglich im Abstand von 12 Stunden durchgeführt. Ab Tag 5 erfolgte zudem über einen Zeitraum von fünf Tagen zweimal täglich eine i.p. Injektion des Proliferationsmarkers BrdU (50 mg/kg KGW in 3 ml/kg KGW NaCl). Im Anschluss an die 25-minütige elektrische Stimulation musste ein Tier aus Gruppe 1 aufgrund anhaltender elektrographischer Aktivität euthanasiert werden. Während der Applikationsphase verstarb zudem ein Tier aus Gruppe 3. Ein Einfluss der Testsubstanz kann ausgeschlossen werden, da dieses Tier nur Vehikellösung erhalten hatte. Nach einer Rekonvaleszenzphase von elf Wochen begann die EEG- und Videoüberwachung spontaner Anfälle, die insgesamt 14 Tage dauerte. Unmittelbar danach folgten die Verhaltensuntersuchungen. Begonnen wurde mit dem OF, gefolgt von der BWB, dem EPM und abschließend dem MWM. Im Anschluss daran wurden die Tiere für immunhistochemische Untersuchungen perfundiert. In Abb. 11 ist der zeitliche Verlauf des Post-SE-Modelles dargestellt.

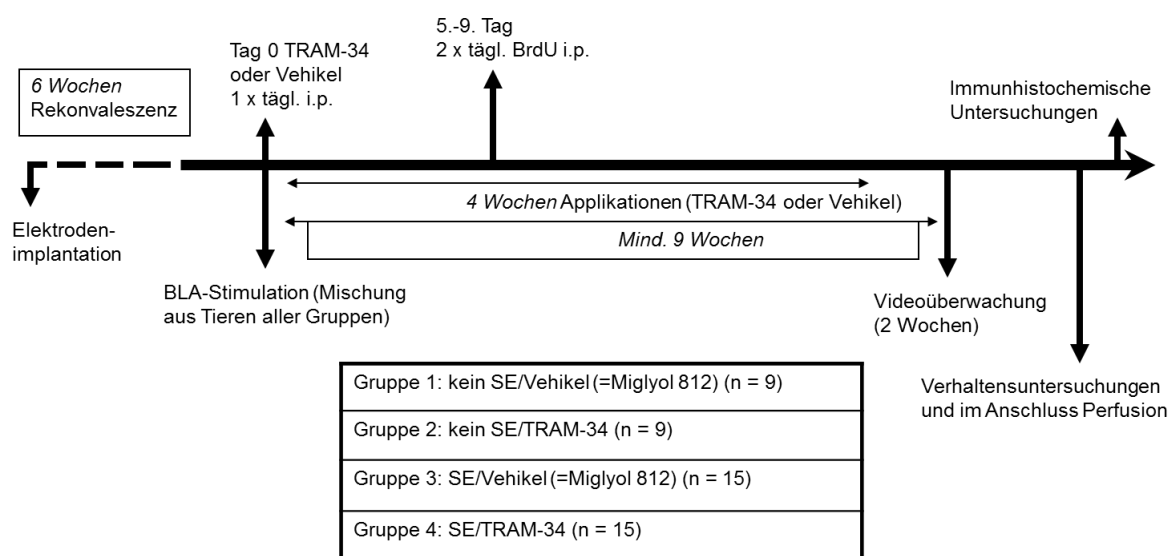


Abb. 11: Zeitlicher Ablauf des Post-SE-Modelles

V. ERGEBNISSE

1. Amygdala-Kindling-Modell

1.1. Beeinflussung der Anfallsparameter durch Modulation der Mikroglia-aktivierung im Amygdala-Kindling-Modell der Temporallappenepilepsie

In einem BLA-Kindling-Modell wurden mögliche Einflüsse durch den Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanal-Blocker TRAM-34 auf die Anfallsschwelle sowie die Anfallsparameter der elektrisch induzierten Anfälle an voll-gekindelten Ratten getestet. Hierfür wurden die Dosierungen 10 mg/kg KGW und 40 mg/kg KGW bei einer Vorbehandlungszeit von jeweils 120 Minuten und erneut die Dosierung 10 mg/kg KGW nach einer Vorbehandlungszeit von 60 Minuten verwendet. Ein Effekt auf die Anfallsschwelle sowie die Anfallsparameter und somit pro- oder antikonvulsive Effekte durch TRAM-34 konnten jedoch bei keiner der verwendeten Dosierungen und Vorbehandlungszeiten gezeigt werden. Es konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Anfallsschwelle (ADT), der Anfallsschwere (SS), der Anfallsdauer (SD1, ADD1) (Abb. 12) sowie der Dauer der postiktalen Phase (SD2) im Vergleich zu den entsprechenden Vehikel-Kontrollversuchen festgestellt werden.

Weiterhin wurde der Einfluss des K^+ -Kanal-Blockers TRAM-34 auf wiederholte Anfälle untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass dieser weder einen signifikanten Einfluss auf die mittlere Anfallsschwere, noch auf die kumulative Dauer der motorischen Anfälle der Tiere während des *Massive* Kindling hatte (Abb. 13).

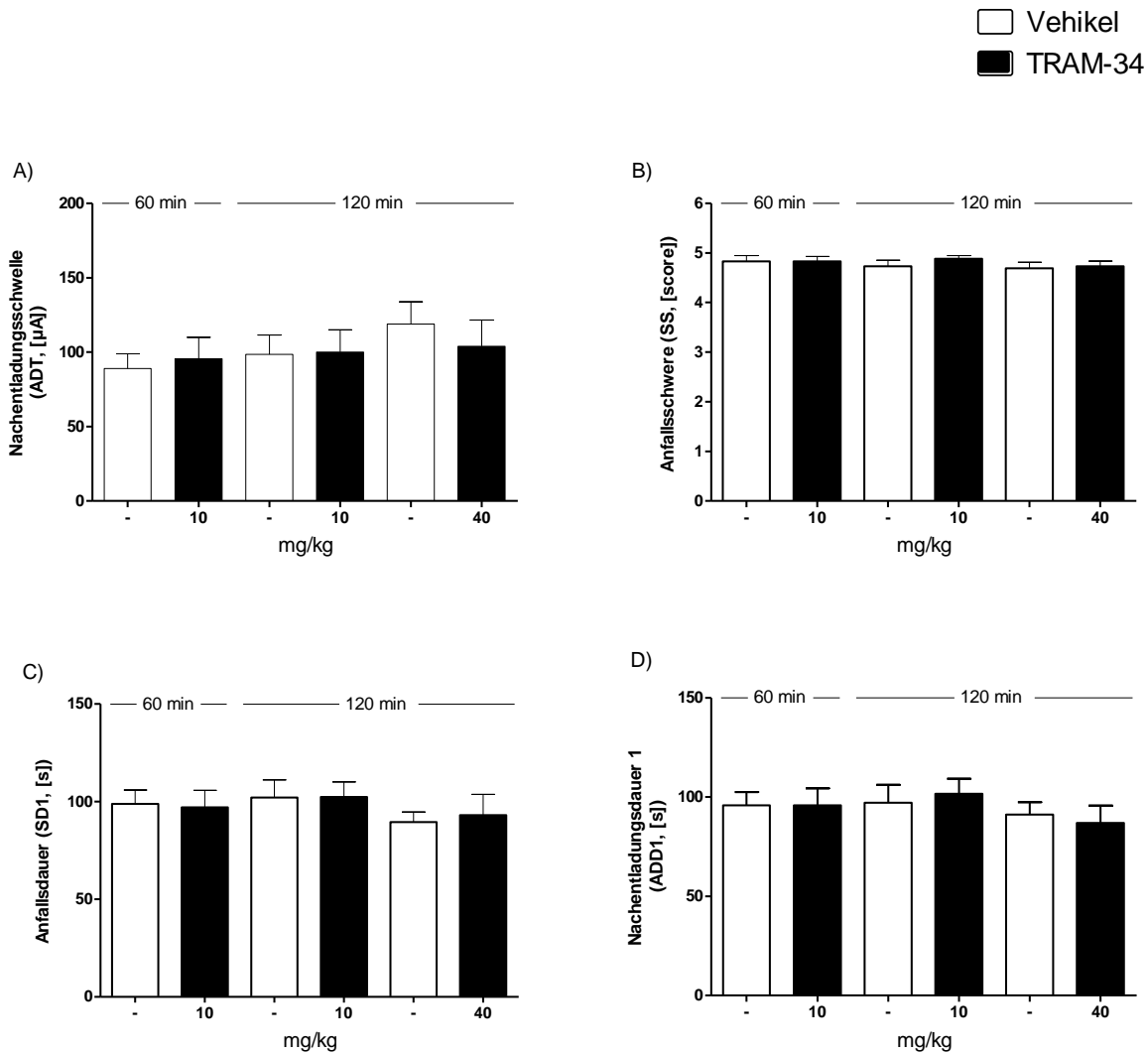


Abb. 12: Effekte von TRAM-34 nach verschiedenen Dosierungen und Vorbehandlungszeiten auf die Anfallsparameter voll-gekindelter Ratten (n=13) im BLA-Kindling-Modell der TLE im Vergleich zu den Vehikel-Tests (Mittelwert \pm SEM). A) Nachentladungsschwelle (ADT), B) Anfallsschwere (SS), C) Anfallsdauer (SD1), D) Nachentladungsdauer 1 (ADD1). Es konnte hierbei kein signifikanter Unterschied bezüglich der verschiedenen Parameter festgestellt werden.

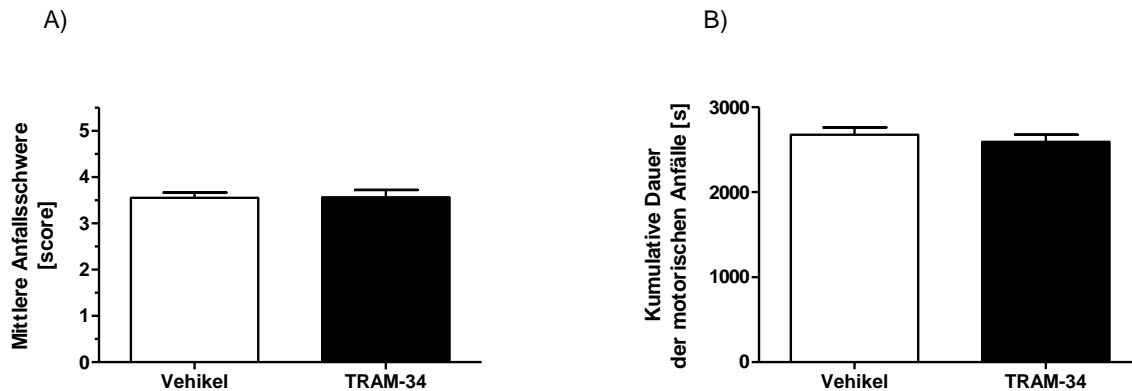


Abb. 13: Einfluss von TRAM-34 auf verschiedene Anfallsparameter während des *Massive* Kindling. A) Mittlere Anfallsschwere, B) Kumulative Dauer der motorischen Anfälle. Es ließen sich bei beiden Parametern keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit TRAM-34 behandelten und den mit Vehikellösung behandelten gekindelten Tieren feststellen.

1.2. Einfluss der Vorbehandlung mit dem Blocker des Kaliumkanals KCa3.1 auf die Wirksamkeit des Standardepileptikums Phenobarbital

Mögliche Einflüsse des Kaliumkanalblockers TRAM-34 auf die Wirksamkeit des Standardepileptikums Phenobarbital wurden im Rahmen des *Massive* Kindling-Modelles getestet. Hierbei sollte festgestellt werden, ob die Behandlung mit Phenobarbital in subtherapeutischer Dosis (8 mg/kg KGW) durch die Vorbehandlung mit TRAM-34 (40 mg/kg KGW; Vorbehandlungszeit 120 min) die verschiedenen Anfallsparameter nach massiven und häufigen Anfällen verändern kann. Zusätzlich wurde vor dem *Massive* Kindling eine weitere Schwellenbestimmung durchgeführt, um den Effekt der massiven Anfälle während des *Massive* Kindling auf die verschiedenen Anfallsparameter zu evaluieren. Hierbei ließ sich feststellen, dass die massiven Anfälle sowohl in der Gruppe der behandelten Tiere, als auch in der Vehikel-Kontrollgruppe die Anfallsschwere signifikant erniedrigten. Die Nachentladungsschwelle hingegen war in beiden Gruppen nach dem *Massive* Kindling signifikant erhöht. Außerdem ließ sich in beiden Gruppen ein Effekt auf die Anfallsdauer sowie die Nachentladungsdauer nach dem *Massive* Kindling feststellen. Beide Parameter waren signifikant erniedrigt (Abb. 15). Zudem war die postiktale Phase signifikant verringert.

Die Gabe von Phenobarbital in subtherapeutischer Dosis führte bei den mit TRAM-34 behandelten Tieren zu einer signifikant längeren Anfallsdauer. Auf alle anderen Parameter hatte diese jedoch keinen messbaren Effekt.

Um einen möglichen Einfluss von TRAM-34 auf die Metabolisierung von Phenobarbital auszuschließen und sicher zu stellen, dass Phenobarbital in subtherapeutischer Konzentration im Plasma vorlag, wurde eine Bestimmung desselben mittels HPLC durchgeführt. Die Phenobarbitalkonzentration lag in allen drei untersuchten Gruppen (Kindling/TRAM-34, Kindling/Vehikel, Sham/Vehikel) unterhalb des therapeutischen Bereiches, der bei Ratten 20-40 µg/ml Plasma beträgt (Abb. 14). Somit konnte eine eventuelle schnellere Metabolisierung von Phenobarbital durch den Einfluss von TRAM-34 ausgeschlossen werden.

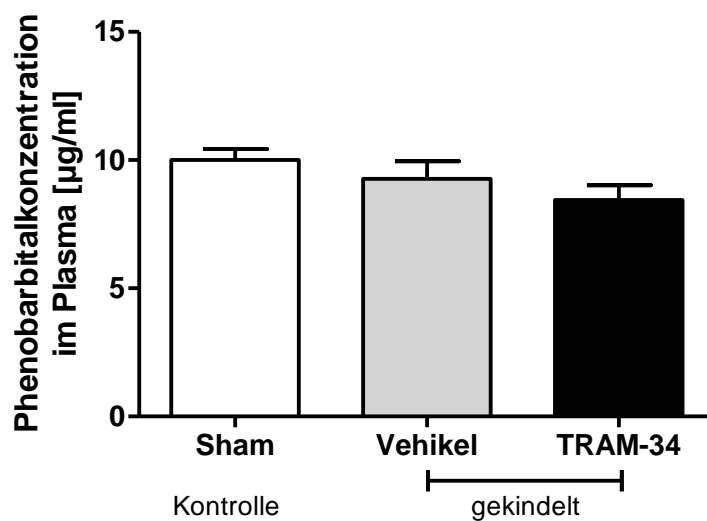


Abb. 14: Plasmaspiegel von Phenobarbital [µg/ml] nach der Schwellenbestimmung. Der Plasmaspiegel befand sich bei allen drei Gruppen im subtherapeutischen Bereich.

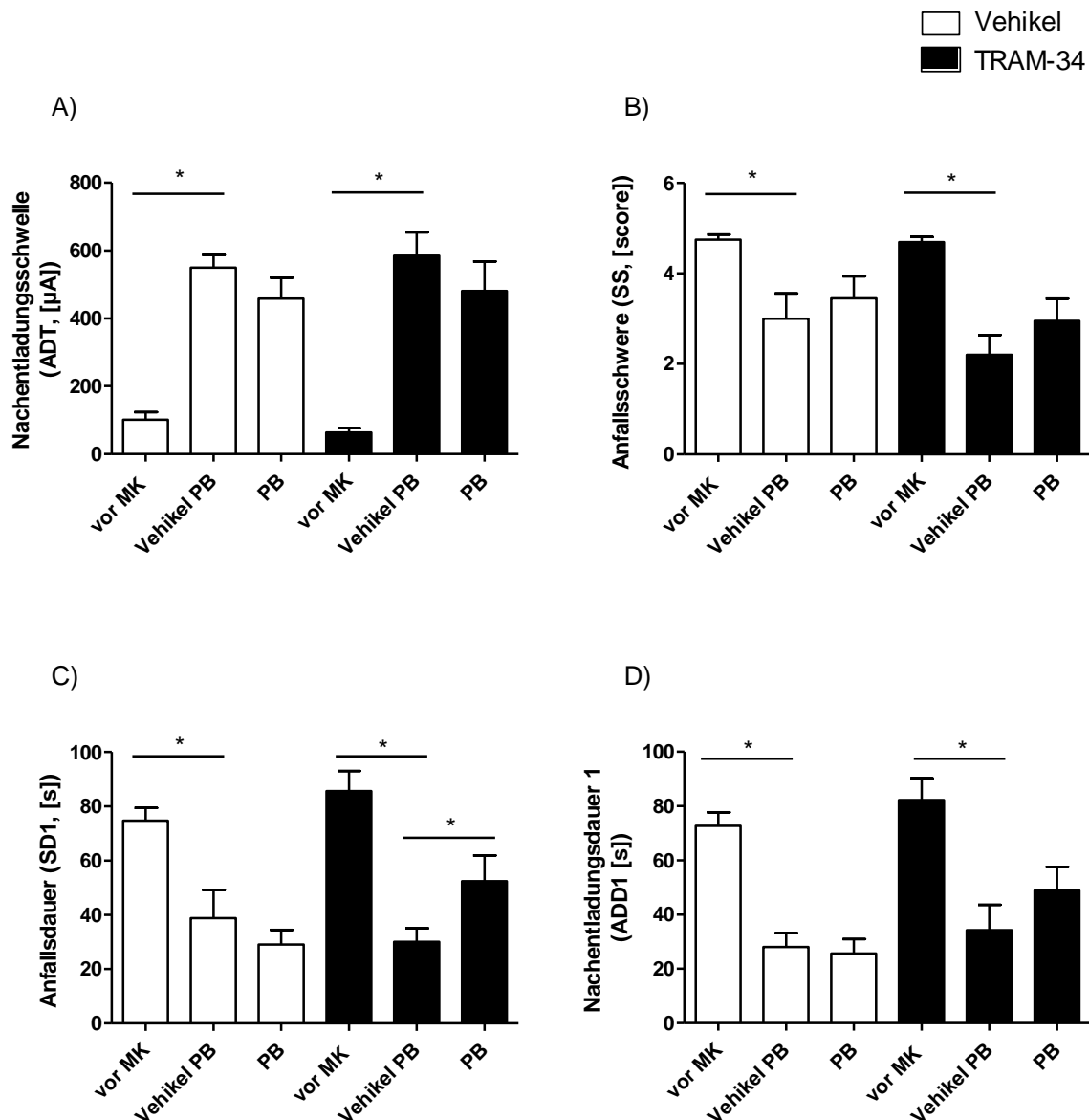


Abb. 15: Zusammenfassung des Einflusses vom *Massive* Kindling (MK) und dem Standardantiepileptikum Phenobarbital (PB) auf die verschiedenen Anfallsparameter. A) Nachentladungsschwelle, B) Anfallsschwere, C) Anfallsdauer, D) Nachentladungsdauer 1 (Mittelwert \pm SEM). Die Nachentladungsschwelle war sowohl bei den mit TRAM-34 behandelten Tieren ($n=10$), als auch bei der Vehikel-Kontrollgruppe ($n=11$) nach dem MK signifikant erhöht. Auch auf die Anfallsschwere konnte in beiden Gruppen ein Effekt durch das MK festgestellt werden. Diese war in beiden Fällen signifikant erniedrigt. Die Anfallsdauer und die Nachentladungsdauer waren zudem in beiden Gruppen signifikant verringert. Die Gabe von Phenobarbital in subtherapeutischer Dosis hatte jedoch nur auf die Anfallsdauer der mit TRAM-34 behandelten Tiere einen messbaren Effekt. Diese war nach der Gabe von Phenobarbital signifikant verlängert. Die anderen gemessenen Parameter wurden hierdurch nicht beeinflusst.

1.3. Beeinflussung der zellulären Veränderungen im Bereich des Hippocampus durch TRAM-34 im Amygdala-Kindling-Modell

Um mögliche Einflüsse des Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanal-Blockers TRAM-34 auf zelluläre Veränderungen im Bereich des Hippocampus feststellen zu können, wurden die Nissl-Färbung, sowie verschiedene immunhistochemische Färbemethoden angewendet.

Nissl-Färbung

Das Ausmaß der Neurodegeneration wurde mit Hilfe eines *Score*-Systems erfasst. Hierzu wurden neurodegenerative Veränderungen im Bereich des *Cornu ammonis*, sowie des piriformen und des parietalen Cortex bewertet (Kapitel IV.1.9). Diese Färbung ermöglichte zudem die Überprüfung der korrekten Lokalisation der Elektrode. Es traten bei den verschiedenen Tiergruppen sowohl im parietalen Cortex, als auch im Bereich der CA-Region des Hippocampus und im piriformen Cortex keine Unterschiede bezüglich der neurodegenerativen Veränderungen auf (Abb. 16). Somit ließ sich auch kein Unterschied zwischen den mit TRAM-34 behandelten gekindelten Tieren und der Kontrollgruppe feststellen.

Färbung des mikroglialen Markers ED1

Das Ausmaß der Mikrogliaaktivierung im Bereich der hippocampalen Formation wurde mittels eines *Score*-Systems semiquantitativ erfasst (Kapitel IV.1.9). Hierbei wurden die CA_1 -, CA_2 -, CA_{3a} - und die $\text{CA}_{3c/4}$ -Region, sowie der GD und der Hilus des Hippocampus differenziert voneinander bewertet. Pro Gruppe wurden jeweils fünf Tiere ausgewertet, wobei sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Tiergruppen feststellen ließ. Zur weiteren Charakterisierung der ED1-positiven Zellen im Hilus des Hippocampus wurde bei derselben Anzahl der Tiere die sensitivere „*optical fractionator*“ Methode angewendet (Kapitel IV.1.9). Die Tiergruppen unterschieden sich auch in diesem Fall nicht in der Anzahl ED1-positiver Zellen.

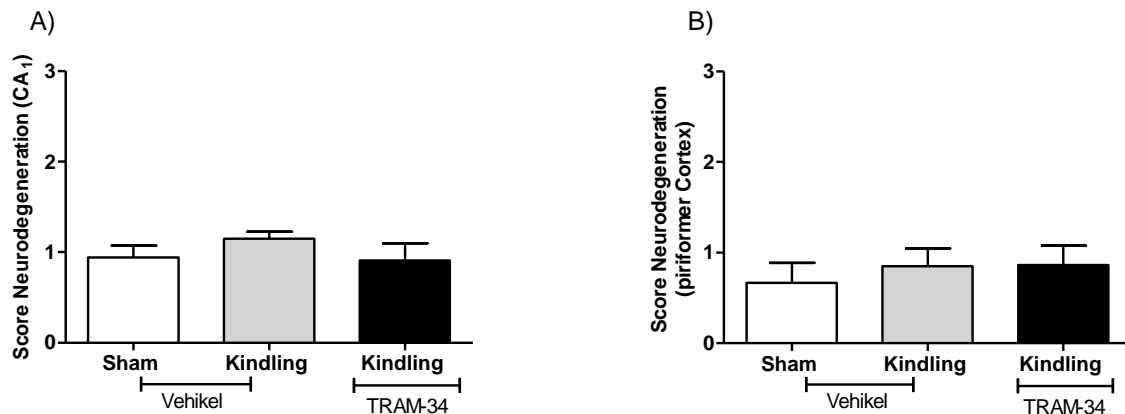


Abb. 16: Beeinflussung neurodegenerativer Veränderungen in der CA₁-Region und im piriformen Cortex durch TRAM-34 im BLA-Kindling-Modell. A) Score der neurodegenerativen Veränderungen in der CA₁-Region, B) Score der neurodegenerativen Veränderungen im piriformen Cortex (Mittelwert \pm SEM). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen festgestellt werden (Sham/Vehikel: n=9; Kindling/Vehikel: n=10; Kindling/TRAM-34: n=11).

Färbung des Zytokins TNF- α

Um das Ausmaß der Zytokinsynthese durch aktivierte Mikrogliazellen im BLA-Kindling-Modell beurteilen zu können, wurde eine stereologische Quantifizierung von TNF- α im Hilus des Hippocampus mittels „*optical fractionator*“ (Kapitel IV.1.9) durchgeführt. Hierbei ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen feststellen.

2. Post-Status-Epilepticus-Modell

Mögliche Einflüsse des Ca²⁺-abhängigen K⁺-Kanal-Blockers TRAM-34 auf neuronale, anfallsinduzierte Veränderungen wurden zudem im chronischen Post-SE-Modell getestet. Die Induktion des SSSE und die hierfür notwendige elektrische Stimulation der BLA wurden wie in Kapitel IV.1.6 beschrieben durchgeführt. Insgesamt wurde bei 30 Tieren ein SSSE induziert. Davon entwickelten 83,3% einen ausschließlich generalisierten SSSE (Typ III). 16,7% der Tiere zeigten vorwiegend fokale Anfallsaktivität, die von generalisierten Anfällen unterbrochen waren (Typ II SSSE). Aufgrund anhaltender elektrographischer Aktivität und fehlenden Ansprechens auf Diazepam musste ein Tier *post stimulationem* euthanasiert werden. Eine Übersicht findet sich in Tabelle 5.

Induktion des SSSE				
	Tierzahlen nach Anfallstyp des SSSE			<i>Exitus post stimulationem</i>
	Typ I (= ausschließlich fokal)	Typ II (= v.a. fokal, von generalisierten Anfällen unterbrochen)	Typ III (=ausschließlich generalisiert)	
SE/TRAM-34	n = 0	n = 2	n = 13	n = 1
SE/Vehikellsg.	n = 0	n = 3	n = 12	n = 0
Gesamtzahl der Tiere pro Anfallstyp / prozentualer Anteil an der Gesamtzahl	n = 0 / 0%	n = 5 / 17%	n = 25 / 83%	n = 1 / 3%

Tabelle 5: Übersicht über die Anzahl der Ratten pro Anfallstyp des SSSE und über die Verluste *post stimulationem*

2.1. Einfluss von TRAM-34 auf die Entstehung spontaner Anfälle im Post-Status-Epilepticus-Modell der Temporallappenepilepsie

Elf Wochen nach der Durchführung der Dauerstimulation der BLA wurde mit der systematischen Video- und EEG-Überwachung spontaner Anfälle begonnen (Kapitel IV.1.6.1), die als Folge des zuvor induzierten SSSE auftraten. Hierdurch sollten mögliche Einflüsse des verwendeten Ca^{2+} -abhängigen K^{+} -Kanal-Blockers TRAM-34 auf die Epileptogenese überprüft werden. Es konnten gleichzeitig 20 Tiere überwacht werden (Tiere der Gruppe SE/Vehikel: n=10, Tiere der Gruppe SE/TRAM-34: n=10). Ausgewertet wurden anschließend die Häufigkeit und die Dauer der Anfälle, sowie die mittlere Anfallsdauer während der 14-tägigen Überwachungsphase. Es konnten hierbei keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. Aus der Gruppe mit Vehikellösung von TRAM-34 behandelte Tiere zeigten acht Tiere spontane Anfälle, aus der Gruppe der mit TRAM-34 behandelten Tiere waren es hingegen nur sieben. In beiden Gruppen gab es jeweils einen „Ausreißer“ mit einer sehr hohen Anfallsfrequenz.

2.2. Prüfung des Effektes von TRAM-34 auf verhaltensassoziierte Veränderungen und kognitive Defizite

Im Anschluss an die Video- und EEG-Überwachung erfolgte die Durchführung verschiedener verhaltensneurophysiologischer Tests (Kapitel IV.1.6.2), um emotionale Verhaltensweisen zu erfassen und kognitive Parameter zu untersuchen. Die Darstellung der erzielten Ergebnisse erfolgt analog der Reihenfolge der Durchführung der einzelnen Verhaltensparadigmen.

Open Field

Um das Spontanverhalten von Nagern zu beurteilen, wird das OF verwendet (Kapitel IV.1.6.2.1). Hierbei stellen das Explorationsverhalten sowie die Lokomotion die zu bewertenden Faktoren dar. Zudem kann dieses Paradigma Hinweise auf ein gestörtes angstassoziiertes Verhalten geben. Die ausgewerteten Daten ergaben signifikante Unterschiede bezüglich der Lokomotionsparameter. Die zurückgelegte Strecke sowie die mittlere Laufgeschwindigkeit waren in beiden stimulierten Gruppen gegenüber ihrer Kontrollgruppe jeweils signifikant erhöht. Beide Gruppen stimulierter Tiere legten somit eine signifikant größere Strecke mit einer signifikant höheren Geschwindigkeit zurück (Abb. 17). Jedoch konnte kein Unterschied zwischen der mit Vehikel behandelten stimulierten Gruppe und der mit TRAM-34 behandelten stimulierten Gruppe festgestellt werden. Außerdem unterschieden sich die Gruppen weder in der Anzahl der *rearings* noch in der Aufenthaltsdauer in den verschiedenen Bereichen des OF.

Black and White Box

Das angstassoziierte Verhalten wurde zusätzlich mit der BWB beurteilt (Kapitel IV.1.6.2.2). Betrachtet wurden hierbei die Latenzzeit bis zum Übertritt in den schwarzen Bereich, die Aufenthaltsdauer in sowohl dem schwarzen, als auch dem weißen Kompartiment, sowie die Anzahl der Übertritte zwischen beiden Bereichen. Manuell wurde zudem die Anzahl der *stretching postures* festgehalten. In keinem dieser Parameter konnten signifikante Unterschiede zwischen den vier Gruppen festgestellt werden.

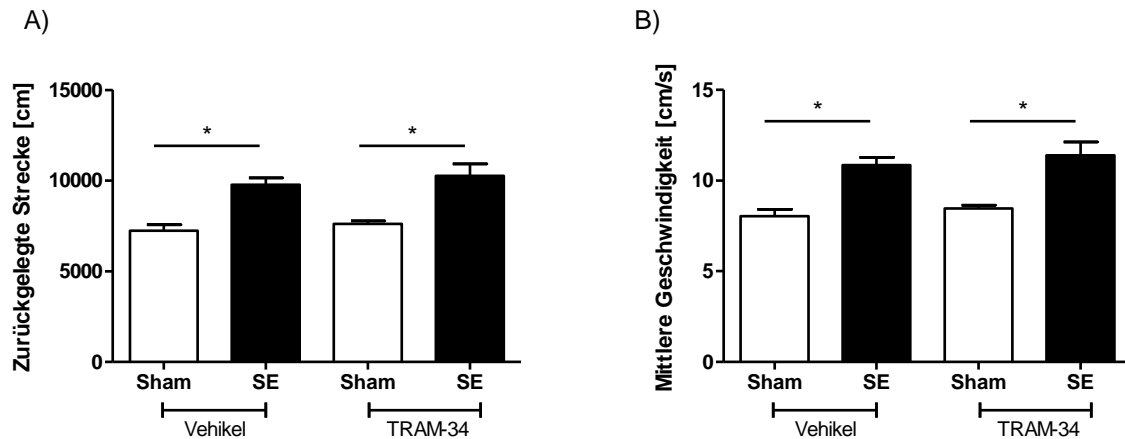


Abb. 17: Einflüsse von TRAM-34 auf das Verhalten im *Open Field*. A) Zurückgelegte Strecke, B) mittlere Geschwindigkeit. Die stimulierten Tiere legten eine deutlich größere Strecke zurück und wiesen dabei eine signifikant erhöhte mittlere Laufgeschwindigkeit im Vergleich zu ihrer jeweiligen Kontrollgruppe auf (Sham/Vehikel: n=9; SE/Vehikel: n=14; Sham/TRAM-34: n=9; SE/TRAM-34: n=12).

Elevated Plus Maze

Das EPM diente zusätzlich zur BWB der Beurteilung des angstassoziierten Verhaltens (Kapitel IV.1.6.2.3). Entscheidende Parameter waren hierbei die Lokomotionsparameter zurückgelegte Strecke und mittlere Laufgeschwindigkeit, sowie die Frequenz und die jeweilige Aufenthaltsdauer auf den offenen bzw. den geschlossenen Armen. Zudem wurde die Häufigkeit der *head dips* und der *stretching postures* betrachtet. Es ließen sich hierbei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen.

Morris Water Maze

Mit dem MWM wurde das räumliche Orientierungsvermögen, sowie die Lern- und Gedächtnisleistung erfasst (Kapitel IV.1.6.2.4). Um die Tiere an die Versuchsbedingungen zu gewöhnen und zudem eventuelle Abweichungen bezüglich der Schwimmgeschwindigkeiten zwischen den Gruppen feststellen zu können, fand zunächst ein Habituationsdurchgang statt. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Lokomotionsparameter zurückgelegte Strecke und mittlere Schwimmgeschwindigkeit zwischen den Gruppen festgestellt werden. In der anschließenden sechstägigen Akquisitionsphase wurde jeweils die Latenzzeit bis zum Auffinden der Plattform gemessen (Abb. 18). An Tag 1 benötigten die Tiere der

Gruppe SE/TRAM-34 signifikant länger, um die Plattform zu finden, als ihre Kontrollgruppe. An den folgenden fünf Tagen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Tiergruppen mehr festgestellt werden.

Direkt im Anschluss an den letzten Durchgang des sechsten Akquisitionstages fand die *spatial probe* statt. Die Plattform wurde hierfür entfernt, um das Erinnerungsvermögen der Tiere an deren ehemalige Position zu testen. Sowohl die Tiere der Gruppe SE/TRAM-34, als auch die Tiere der Gruppe SE/Vehikel brauchten signifikant länger als die dazugehörige Kontrollgruppe, um die ehemalige Position der Plattform zu finden. Zudem war die Anzahl der Kreuzungen der ehemaligen Plattformposition bei den Tieren beider stimulierter Gruppen im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. Tiere der Gruppe SE/Vehikel verbrachten zudem signifikant mehr Zeit in dem Quadranten, in dem sich zuvor die Plattform befunden hatte, als ihre Kontrollgruppe. Hinsichtlich der mittleren Schwimmgeschwindigkeit ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen (Abb. 19).

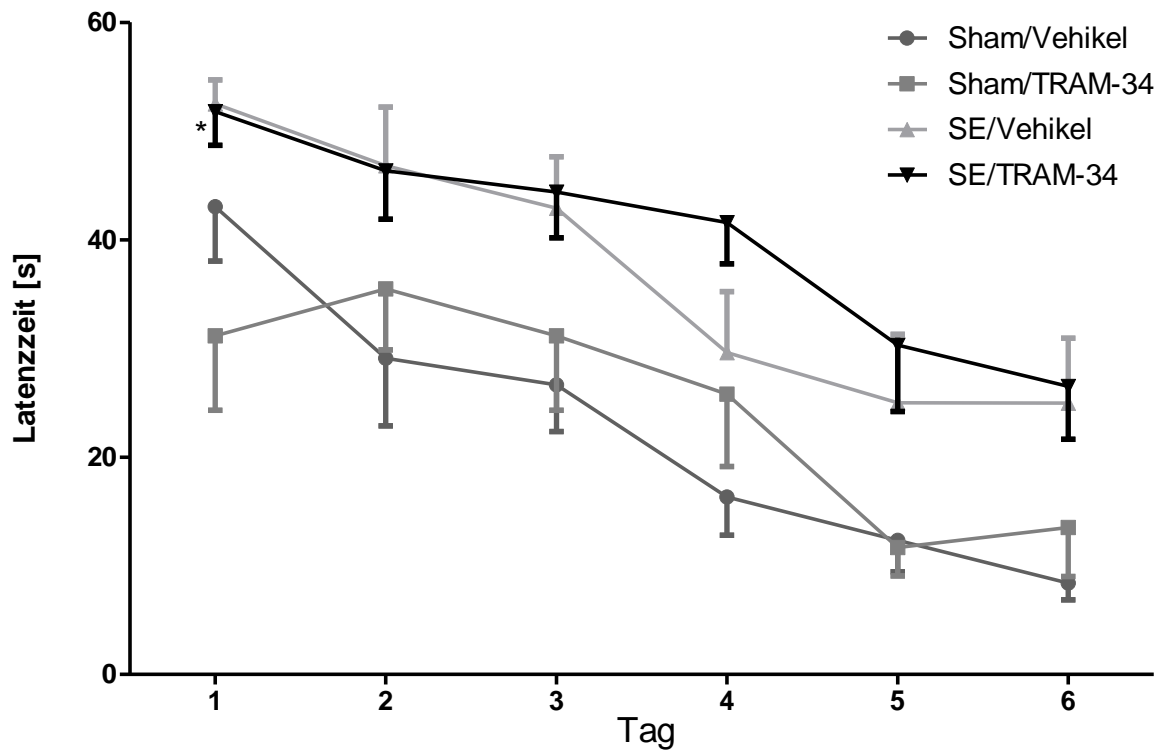


Abb. 18: Effekte von TRAM-34 auf die Lernleistung der Tiere im MWM. Lernkurve nach mehrtägigem Training (Mittelwert \pm SEM). An Tag 1 benötigten die Tiere der Gruppe SE/TRAM-34 signifikant länger, um die Plattform zu finden, als ihre Kontrollgruppe. An den folgenden Tagen ließ sich kein Unterschied in der Latenzzeit zum Auffinden der Plattform zwischen den SE-Tieren und ihrer jeweiligen Kontrollgruppe feststellen (Sham/Vehikel: $n=8$; SE/Vehikel: $n=13$; Sham/TRAM-34: $n=9$; SE/TRAM-34: $n=12$).

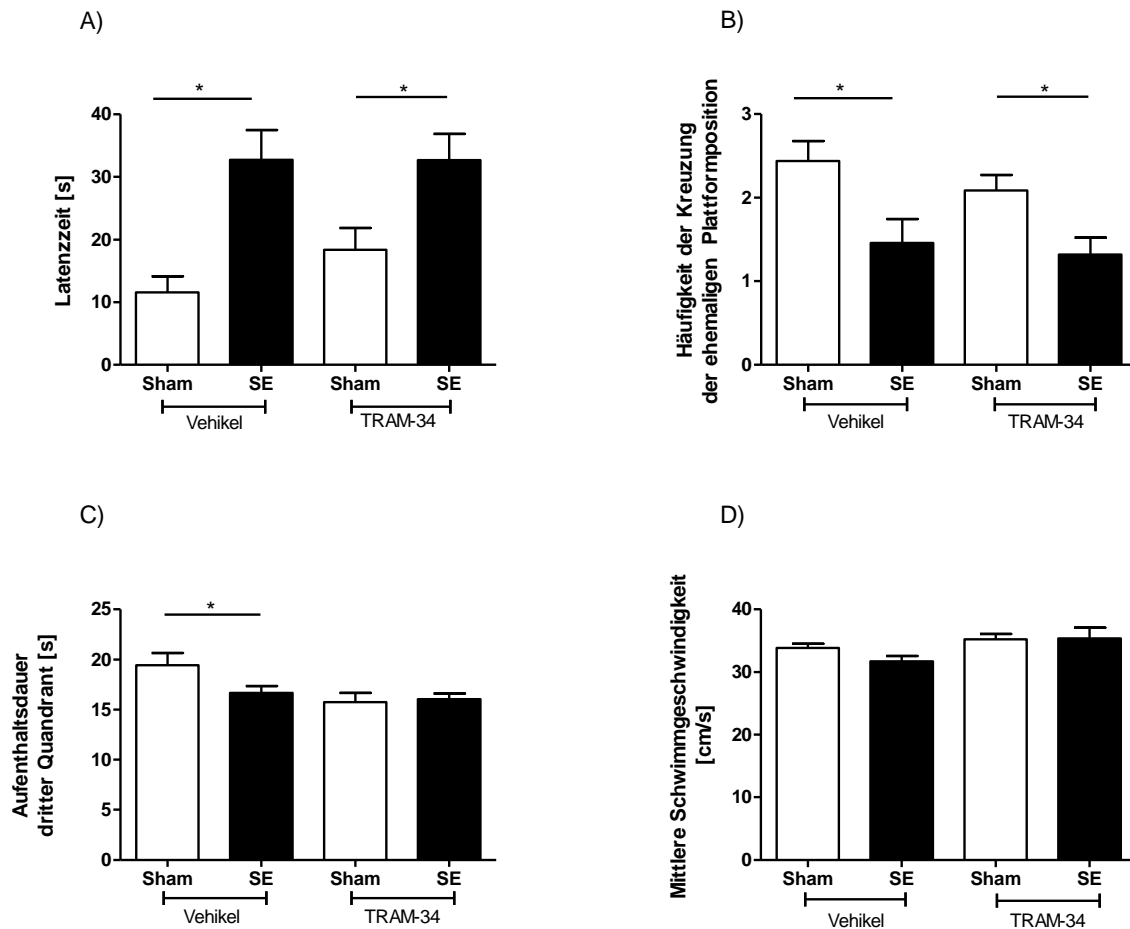


Abb. 19: Einfluss von TRAM-34 auf die Gedächtnisleistung in der *spatial probe* des MWM. A) Latenzzeit bis zum ersten Erreichen der ehemaligen Plattformposition, B) Häufigkeit der Kreuzung der ehemaligen Plattformposition, C) Aufenthaltsdauer im dritten Quadranten, D) Mittlere Schwimmgeschwindigkeit (Mittelwert \pm SEM). Die Latenzzeit bis zum Erreichen der ehemaligen Plattformposition war in beiden stimulierten Gruppen gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe signifikant erhöht. Außerdem kreuzten die Tiere beider stimulierten Gruppen die ehemalige Plattformposition signifikant seltener. Tiere der Gruppe SE/Vehikel verbrachten signifikant weniger Zeit in dem Quadranten, in dem zuvor die Plattform zu finden war. Die verschiedenen Gruppen unterschieden sich in der *spatial probe* jedoch nicht in der mittleren Schwimmgeschwindigkeit.

2.3. Beeinflussung der zellulären Veränderungen im Bereich des Hippocampus durch TRAM-34 im Post-Status-Epilepticus-Modell

Entsprechend dem BLA-Kindling-Modell wurden auch im Post-SE-Modell histologische und immunhistochemische Färbungen durchgeführt, um den Einfluss von TRAM-34 auf mögliche zelluläre Veränderungen im Bereich des Hippocampus zu überprüfen.

Nissl-Färbung

Neuronale Zellverluste wurden mittels eines *Score*-Systems quantifiziert (Kapitel IV.1.9). Die Skala die hierbei zur Bewertung herangezogen wurde reichte von 0 (= keine Neurodegeneration) bis 3 (= starke Neurodegeneration). Zusätzlich ermöglichte diese Färbemethode die Bestätigung der korrekten Lage der Stimulations- und Ableitungselektrode. Analog zu dem Kindling-Modell wurden auch hier sowohl der parietale Cortex, als auch die verschiedenen Bereiche des *Cornu ammonis* und der piriforme Cortex getrennt voneinander bewertet. Im parietalen Cortex, in der CA₂- und in der CA_{3c/4}-Region, sowie im piriformen Cortex waren die neuronalen Zellverluste bei beiden stimulierten Tiergruppen signifikant größer als bei der jeweiligen Kontrollgruppe (Abb. 20 und Abb. 21). Die CA₁- sowie die CA_{3a}-Region des Hippocampus zeigten ein ähnliches Bild. Zudem ließ sich in diesen Regionen ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden stimulierten Gruppen feststellen. Die mit Tiere der Gruppe SE/TRAM-34 zeigten einen signifikant größeren neuronalen Zellverlust als die Tiere der Gruppe SE/Vehikel (Abb. 20).

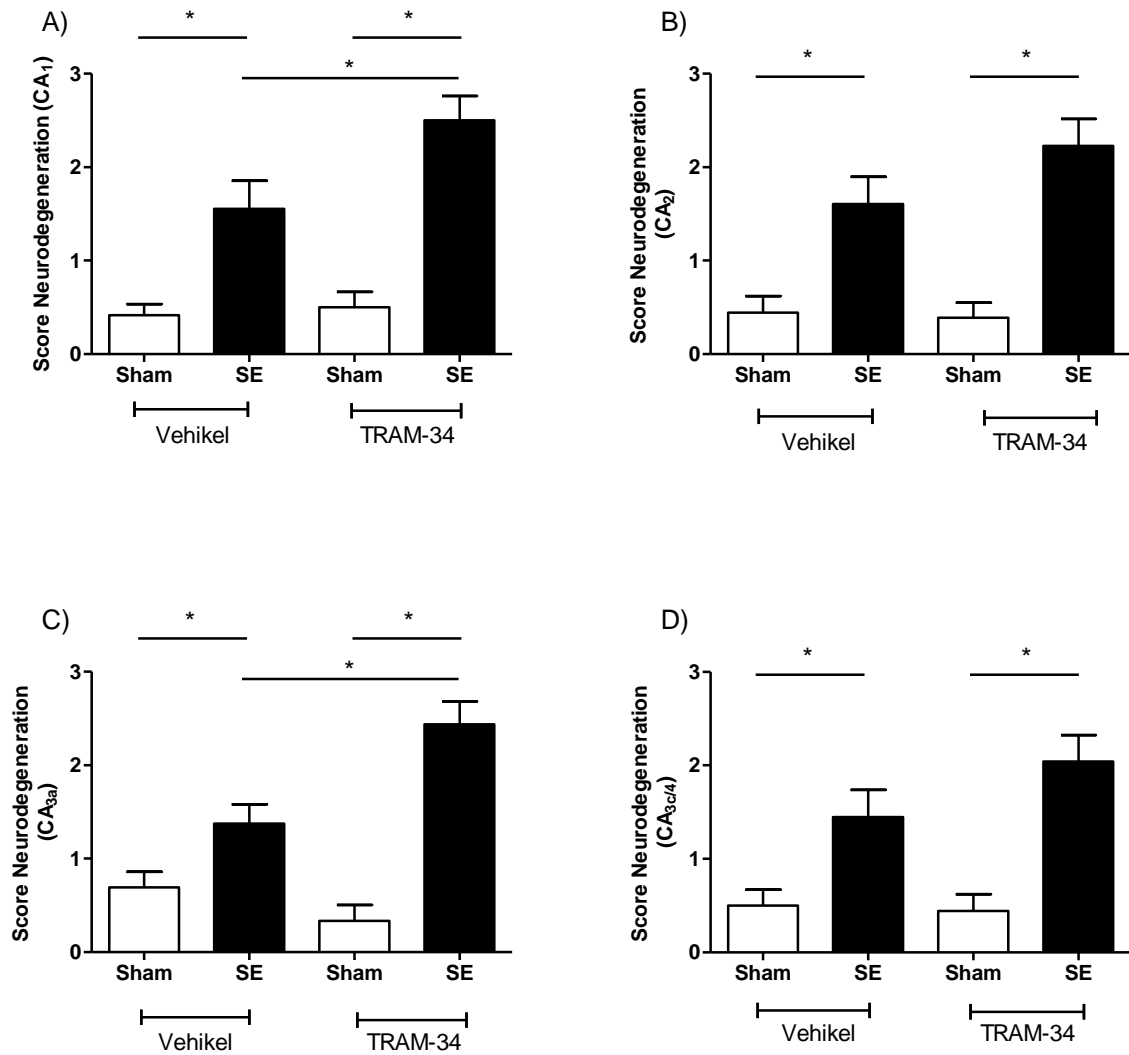


Abb. 20: Beeinflussung neuronaler Zellverluste durch TRAM-34 im Post-SE-Modell. Score der neuronalen Zellverluste in A) der CA₁-Region, B) der CA₂-Region, C) der CA_{3a}-Region, D) der CA_{3c/4}-Region des Hippocampus (Mittelwert \pm SEM). Die neuronalen Zellverluste waren bei den stimulierten Gruppen im Gegensatz zu ihrer jeweiligen Kontrollgruppe signifikant erhöht. Zudem ließ sich in der CA₁-Region (A) sowie in der CA_{3a}-Region (C) des Hippocampus ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden stimulierten Gruppen feststellen. Die Tiere der Gruppe SE/TRAM-34 zeigten hierbei einen ausgeprägteren neuronalen Zellverlust als die Tiere der Gruppe SE/Vehikel (Sham/Vehikel: n=9; SE/Vehikel: n=14; Sham/TRAM-34: n=9; SE/TRAM-34: n=12).

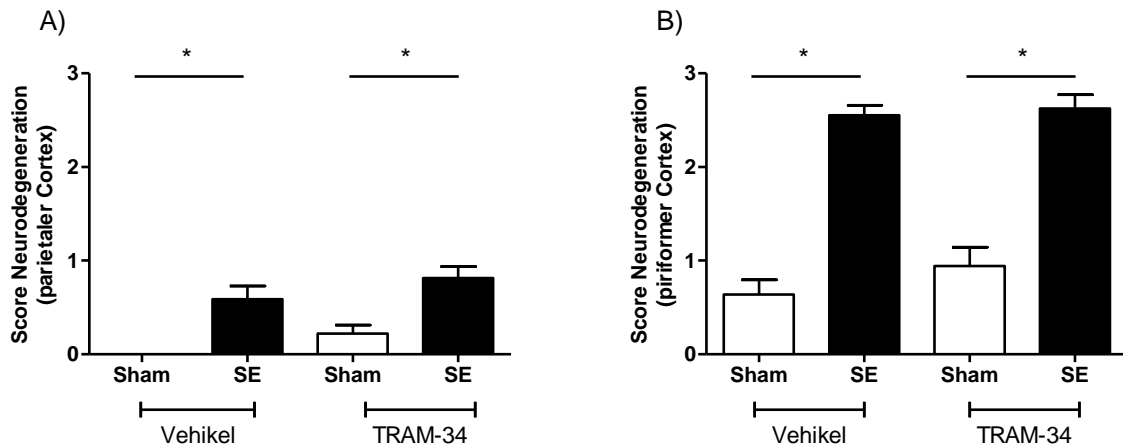


Abb. 21: Beeinflussung neuronaler Zellverluste durch TRAM-34 im Post-SE-Modell. Score der neuronalen Zellverluste A) im parietalen Cortex, B) im piriformen Cortex (Mittelwert \pm SEM). Sowohl die mit Vehikel, als auch die mit TRAM-34 behandelte stimulierte Gruppe zeigte ausgeprägtere neuronale Zellverluste im Vergleich zu ihrer jeweiligen Kontrollgruppe. Ein Einfluss von TRAM-34 konnte hierbei jedoch nicht beobachtet werden (Sham/Vehikel: $n=9$; SE/Vehikel: $n=14$; Sham/TRAM-34: $n=9$; SE/TRAM-34: $n=12$).

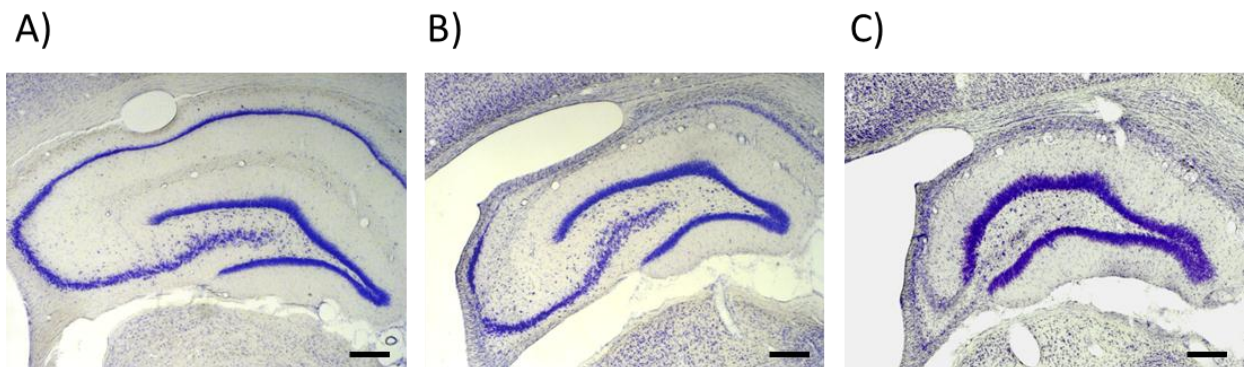


Abb. 22: Vergleich des Ausmaßes der Neurodegeneration im Bereich des Hippocampus zwischen einem Kontrolltier (A), einem mit Vehikellösung behandelten epileptischen Tier (B) und einem mit TRAM-34 behandelten epileptischen Tier. Der SE führte sowohl bei mit Vehikellösung als auch bei mit TRAM-34 behandelten Tieren zu einer signifikanten Zunahme der neuronalen Zellverluste. Bei mit TRAM-34 behandelten epileptischen Tieren war die Neurodegeneration jedoch am stärksten. Maßstab Balken = 200 μ m

Färbung des mikroglialen Markers ED1

Das Ausmaß der Mikrogliaaktivierung im Bereich der hippocampalen Formation wurde mittels eines Score-Systems erfasst (Kapitel IV.1.9). Hierbei wurden die CA₁-, CA₂-, CA_{3a}- und die CA_{3c/4}-Region, sowie der GD und der Hilus des Hippocampus anhand von drei aufeinanderfolgenden Gehirnschnitten differenziert voneinander bewertet. Die Anzahl der aktivierten Mikrogliazellen war in allen Bereichen der hippocampalen Formation bei beiden stimulierten Gruppen im Vergleich zu ihrer jeweiligen Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abb. 23).

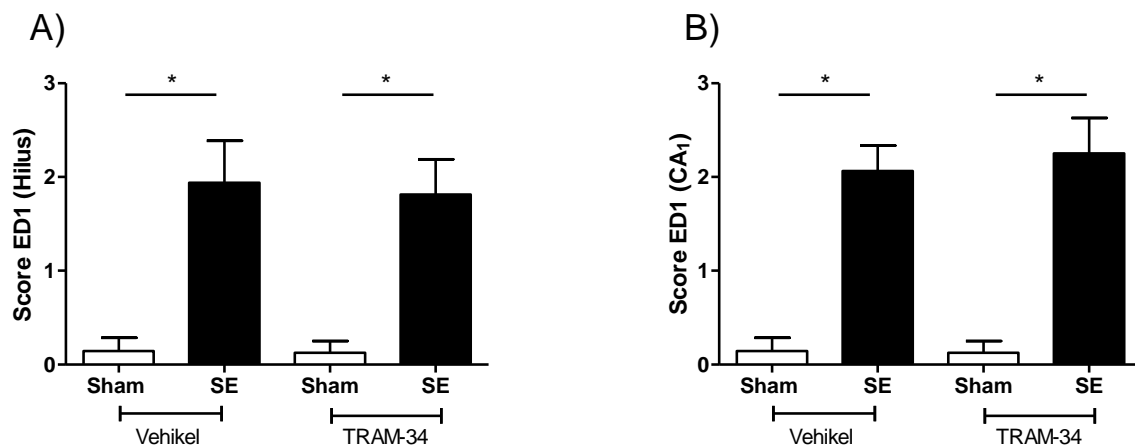


Abb. 23: Einfluss von TRAM-34 auf die Mikrogliaaktivierung im Post-SE-Modell. Score der Mikrogliaaktivierung A) im Hilus, B) in der CA₁-Region des Hippocampus (Mittelwert \pm SEM). In beiden Hirnarealen ist die Anzahl der ED1-positiven Zellen bei den epileptischen Tieren im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe signifikant erhöht (Sham/Vehikel: n=7; SE/Vehikel: n=8; Sham/TRAM-34: n=8; SE/TRAM-34: n=8).

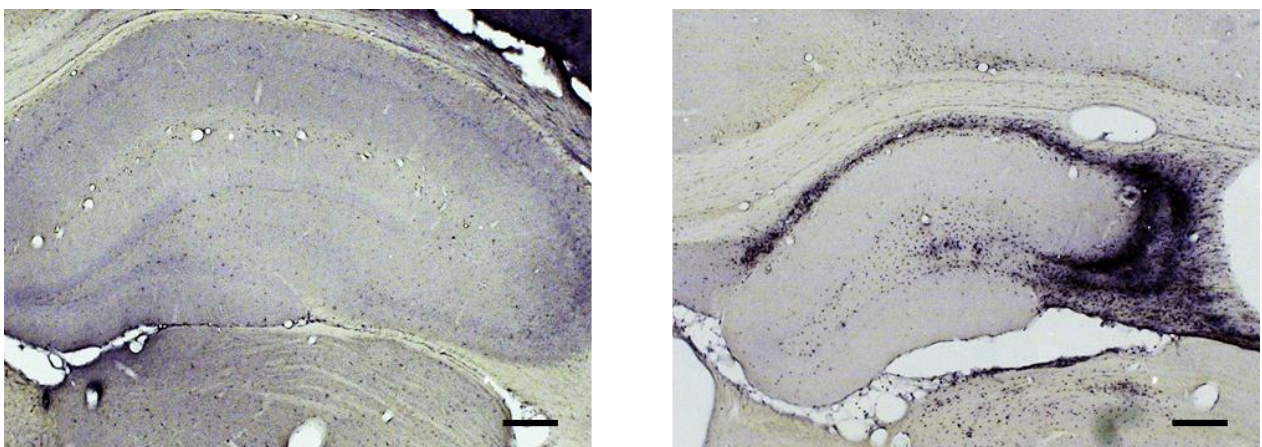


Abb. 24: Vergleich der Mikrogliaaktivierung zwischen einem Kontrolltier (links) und einem mit Vehikellösung behandelten epileptischen Tier (rechts). Die Mikrogliaaktivierung ist beim epileptischen Tier im Vergleich zum Kontrolltier signifikant erhöht. Maßstabballen = 200 μ m

Färbung des Zytokins TNF- α

Um das Ausmaß der Zytokinausschüttung durch aktivierte Mikrogliazellen im Post-SE-Modell beurteilen zu können, wurde eine stereologische Quantifizierung von TNF- α an sechs aufeinanderfolgenden Gehirnschnitten im Hilus des Hippocampus mittels „*optical fractionator*“ (Kapitel IV.1.9) durchgeführt. Hierbei ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen feststellen.

BrdU/NeuN-Färbung

Die Quantifizierung neugebildeter Zellen im Bereich der hippocampalen Formation erfolgte mittels immunhistochemischen Nachweises des Proliferationsmarkers BrdU (Kapitel IV.1.8.2). Die Anzahl BrdU-positiver Zellen wurde mithilfe des konfokalen Mikroskops mittels Fluoreszenztechnik an sechs aufeinanderfolgenden Gehirnschnitten im Bereich des GD sowie des Hilus bestimmt. Hierbei wurden die Schnitte einzeln quantifiziert und im Anschluss aufsummiert. Die Quantifizierung der BrdU- sowie der BrdU/NeuN-positiven Zellen im Bereich des Hilus ergab im Vergleich zu bisher durchgeführten Studien ungewöhnlich hohe Werte und wurde daher in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt. Der GD wies hingegen das uns bekannte Verteilungsmuster dieser Zellen auf. Sowohl bei den mit TRAM-34 als auch bei den mit Vehikellösung behandelten Tieren war die Anzahl an BrdU-positiven Zellen signifikant erhöht (Abb. 25). Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden stimulierten Gruppen ließ sich hierbei jedoch nicht feststellen. Zudem wurde eine BrdU/NeuN-Doppelmarkierung durchgeführt, um aus den gesamten neugebildeten Zellen im GD speziell neugebildete Neurone zu identifizieren. Die Auswertung doppelmarkierter Zellen erfolgte analog zu der der BrdU-positiven Zellen. Zudem gewährleistete die Analyse der konfokalen Z-Serien hierbei die korrekte Bestimmung doppelmarkierter Zellen. Mit TRAM-34 behandelte stimulierte Tiere wiesen im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Anzahl an doppelmarkierten Zellen auf. Mit Vehikellösung behandelte Tiere unterschieden sich dabei nicht signifikant in der Anzahl BrdU/NeuN-positiver Zellen. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden SE-Gruppen ließ sich hierbei jedoch nicht feststellen (Abb. 25).

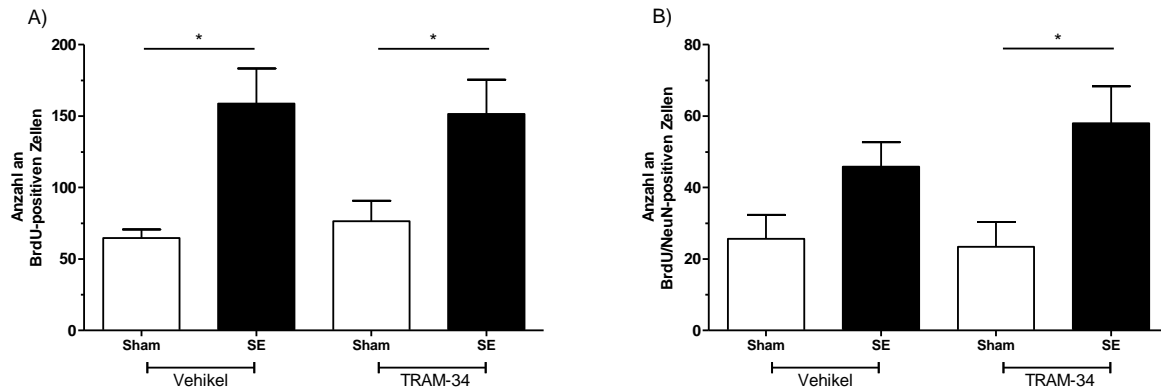


Abb. 25: Einfluss von TRAM-34 auf die Neubildung von Zellen im Bereich des GD im Post-SE-Modell. A) Anzahl BrdU-positiver Zellen, B) Anzahl BrdU/NeuN-positiver Zellen (Mittelwert \pm SEM). Die Anzahl BrdU-positiver Zellen war bei beiden stimulierten Gruppen im Vergleich zu ihrer jeweiligen Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die Anzahl BrdU/NeuN-positiver Zellen unterschied sich nicht signifikant zwischen den mit Vehikellösung behandelten Gruppen, es konnte jedoch eine signifikant erhöhte Anzahl BrdU/NeuN-positiver Zellen bei mit TRAM-34 behandelten Tieren der stimulierten Gruppe im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe festgestellt werden (Sham/Vehikel: n=9; SE/Vehikel: n=14; Sham/TRAM-34: n=9; SE/TRAM-34: n=12).

VI. DISKUSSION

Einführung

Die früheste detaillierte Beschreibung verschiedener Anfallstypen stammt von einem auf Steintafeln geschriebenen babylonischen Text aus dem Jahre um 1000 vor Christus (HUNT et al. 2007). Die Babylonier waren der Ansicht, dass hinter jedem Anfallstyp eine Besessenheit von einem bestimmten Dämon oder einer verstorbenen Seele stand (WILSON u. REYNOLDS 1990). Demzufolge beschränkte sich die Behandlung solcher Anfälle auf spirituelle Methoden. Erst circa 400 vor Christus stellte Hippocrates fest, dass Anfälle ein rein körperliches Leiden darstellen und es sich hierbei eher um die Manifestation einer Anomalität im Gehirn als um übernatürliche Einflüsse handelt (TEMKIN 1933). Im späten 19. Jahrhundert erkannte schließlich der britische Neurologe John H. Jackson, dass Anfällen eine neuronale Dysfunktion zugrunde liegt (HUNT et al. 2007). Diese Erkenntnisse bildeten das Fundament für die heutzutage anerkannten Prinzipien der modernen Epilepsieforschung. Trotz andauernder intensiver Forschung existiert bis heute weder die Möglichkeit Epilepsie zu heilen, noch eine Möglichkeit die Erkrankung zu verhindern (D'AMBROSIO et al. 2013). Die derzeit verwendeten Medikamente entfalten lediglich symptomatische Wirkung, wobei ein Drittel aller Epilepsiepatienten therapieresistent ist. Therapieresistenz wird hierbei definiert als die erfolglose Behandlung mit mindestens zwei tolerierten und geeigneten AEs. Diese können dabei entweder als Monotherapie oder als Kombinationstherapie verabreicht werden (KWAN et al. 2010). In den letzten zwei Jahrzehnten wurden mehr als 15 neue antikonvulsive Wirkstoffe auf den Markt gebracht, welche die Therapiesituation jedoch nur geringfügig verbessern konnten, wenn man den Anteil der Patienten betrachtet, bei der eine komplette Anfallsfreiheit erzielt werden konnte (BRODIE et al. 2012). Das Problem der Pharmakoresistenz macht es erforderlich, sich auf Behandlungsmöglichkeiten zu konzentrieren, die auf die Prävention der zugrundeliegenden Erkrankung abzielen (LOSCHER u. SCHMIDT 2011). Epilepsie bedeutet für die betroffenen Menschen durch die erhöhte Unfallgefahr und Stigmatisierung zudem immer einen Verlust von Lebensqualität und geht häufig mit psychischen Komorbiditäten einher (BAKER et al. 1997; BAUMGARTNER 2001; PAULI u. STEFAN 2009a). Ein Eingriff in den Prozess der Epileptogenese könnte die Entwicklung von chronischen, spontanen, wiederkehrenden Anfällen verhindern oder zumindest beschränken (D'AMBROSIO et al. 2013) und somit erheblich zur

Verbesserung der Lebensqualität der Patienten beitragen. Entzündliche Prozesse, wie sie zum Beispiel nach einem Schädel-Hirn-Trauma auftreten, scheinen sowohl bei der Iktogenese als auch der Epileptogenese eine große Rolle zu spielen (RAVIZZA et al. 2011; VEZZANI et al. 2011; VEZZANI et al. 2013). Die Beeinflussung neuroinflammatorischer Signalwege stellt somit einen vielversprechenden Ansatzpunkt bei der Entwicklung von Wirkstoffkandidaten mit antiepileptogener und antiiktogener Wirkung dar (D'AMBROSIO et al. 2013). Sowohl bei humaner Epilepsie als auch bei experimentellen Epilepsiemodellen sind Mikrogliazellen wesentlich an Entzündungsprozessen beteiligt (VEZZANI et al. 2000; DUBE et al. 2010; ZOLKOWSKA et al. 2012). Der calciumabhängige Kaliumkanal KCa3.1 spielt eine große Rolle bei der Mikrogliaaktivierung und ist somit mitverantwortlich für die Regulation der Produktion proinflammatorischer und gewebeschädigender Substanzen (KAUSHAL et al. 2007; MAEZAWA et al. 2012). Er scheint hierbei insbesondere zur Erhaltung eines negativen Membranpotenzials beizutragen, welches für die Aufrechterhaltung des Calciumeinstroms von Bedeutung ist (WULFF u. CASTLE 2010). Somit könnte eine Blockade von KCa3.1 der chronischen Erhöhung intrazellulärer Calciumkonzentrationen entgegenwirken, welche mit chronischen neuroinflammatorischen Zuständen assoziiert ist (KAUSHAL et al. 2007). Dieser Rezeptor scheint somit eine geeignete Zielstruktur zur Modulation der Mikrogliafunktion zu sein, bei der die schädlichen Effekte unter Erhaltung der vorteilhaften Effekte wie beispielsweise der Phagozytose gehemmt werden (WULFF u. CASTLE 2010). Im Jahr 2000 entwickelte die Arbeitsgruppe um Heike Wulff TRAM-34 als einen potenten und selektiven Blocker dieses Rezeptors (WULFF et al. 2000). In zahlreichen *in vitro* wie *in vivo* Studien konnte bereits gezeigt werden, dass KCa3.1-Blocker und hierbei insbesondere TRAM-34 die Entzündungsprozesse im Gehirn verringern können und somit neuroprotektive Eigenschaften besitzen (REICH et al. 2005; KAUSHAL et al. 2007; BOUHY et al. 2011; CHEN et al. 2011). In der vorliegenden Studie wurde mithilfe von chronischen Epilepsiemodellen untersucht, ob TRAM-34 einen krankheitsmodifizierenden Einfluss besitzt und die Epileptogenese sowie die Iktogenese verhindern oder zumindest positiv beeinflussen kann. Zudem wurde der Einfluss von TRAM-34 auf epilepsieassoziierte Komorbiditäten wie verhaltensassoziierte Veränderungen und kognitive Defizite, sowie auf zellulärer Ebene evaluiert.

Effekte von TRAM-34 im Amygdala-Kindling-Modell

Der akute Effekt von TRAM-34 auf die verschiedenen Anfallsparameter wurde im Amygdala-Kindling-Modell untersucht. Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte weder ein pro- noch antikonvulsiver Effekt von TRAM-34 auf die Anfallsentstehung, -ausbreitung sowie -terminierung der Anfälle vollgekindelter Ratten festgestellt werden (Abb. 12). Das Amygdala-Kindling-Modell besitzt eine sehr hohe prädiktive Validität für Epilepsien mit komplex-fokalen Anfällen, zu denen auch die TLE zählt (LÖSCHER 1997). Demzufolge kann davon ausgegangen werden, dass keine prokonvulsiven Effekte wie erhöhte Anfallsfrequenz oder gesteigerte Anfallsschwere bei einer *Add-on*-Therapie mit TRAM-34 auftreten. Eventuelle krankheitsmodifizierende Einflüsse wurden in einem *Massive* Kindling-Paradigma untersucht, welches etabliert wurde, um TLE mit einer hohen Anfallsdichte zu imitieren (PEKCEC et al. 2009). Dies ermöglicht eine Abschätzung des Einflusses einer subchronisch applizierten Testsubstanz auf die Anfallsentstehung und die Anfallsschwelle. Es konnte hierbei kein positiver Effekt von TRAM-34 auf die mittlere Anfallsschwere bzw. die kumulative Anfallsdauer nach wiederholten Anfällen festgestellt werden (Abb. 13). Der Kindlingprozess führte bei vollgekindelten Tieren zur Ausbildung eines hyperexzitatorischen Netzwerkes im Gehirn und zahlreichen weiteren zellulären und molekularen Veränderungen (LÖSCHER 2002; MCINTYRE u. GILBY 2008). Eine positive Wirkung von TRAM-34 auf diese Veränderungen konnte im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen nicht gezeigt werden. Dies spricht gegen einen relevanten krankheitsmodifizierenden Effekt von KCa3.1. Im Rahmen des *Massive* Kindlings wurde zudem der Einfluss von TRAM-34 auf die subtherapeutische Gabe des Standardepileptikums Phenobarbital untersucht. Der Plasmaspiegel lag hierbei im subtherapeutischen Bereich, wodurch eine etwaige schnellere Metabolisierung von Phenobarbital durch TRAM-34 ausgeschlossen werden konnte. Frühere Forschungsergebnisse belegen eine Steigerung der Effizienz von Phenobarbital durch die Gabe eines EP1-Rezeptor-Agonisten, sodass die kombinierte Gabe dieser beiden Substanzen zu einer deutlichen Senkung der Anfallsschwelle führte (PEKCEC et al. 2009). Dieser Effekt ließ sich in unserer Studie nicht beobachten. Ein möglicher Grund hierfür könnte die unterschiedliche Wirkungsweise der beiden verwendeten Substanzen sein. Der EP1-Rezeptor-Agonist verhindert die anfallsinduzierte Hochregulierung des Efflux-Transporters P-Glykoprotein an der BHS, was zu einer gesteigerten Effektivität antiepileptischer Wirkstoffe führt

(PEKCEC et al. 2009). Auch für den im Rahmen dieser Studie verwendeten Wirkstoff TRAM-34 ist ein Einfluss auf Efflux-Transporter an der BHS nicht auszuschließen. Unsere Ergebnisse unterstützen diese These jedoch nicht.

Effekte von TRAM-34 im Post-Status-Epilepticus-Modell

Infolge der Dauerstimulation der BLA entwickelten die Tiere einen SSSE. Die anhaltende Anfallsaktivität führte hierbei zu zahlreichen neuroplastischen Veränderungen, zu denen unter anderem die Neurodegeneration zählt (BRANDT et al. 2003). Durch die direkt im Anschluss an den SSSE begonnene Behandlung mit TRAM-34 konnte weder die Anfallsfrequenz noch die mittlere Anfallsdauer der während der 14-tägigen Überwachungsphase auftretenden spontanen Anfälle beeinflusst werden (siehe Kapitel V.2.1). Ein Einfluss von TRAM-34 auf den Prozess der Epileptogenese konnte somit nicht nachgewiesen werden.

Ängstlichkeit, Psychosen und aggressives Verhalten zählen zu den häufigsten psychiatrischen Komorbiditäten bei Epilepsiepatienten (KANNER 2004). Um Veränderungen bezüglich des Verhaltens der Tiere und kognitiver Defizite erfassen zu können, wurden verschiedene Verhaltensuntersuchungen durchgeführt. Mit den Paradigmen OF, BWB sowie EPM wurden das angstassoziierte Verhalten sowie die lokomotorische Aktivität der Tiere erfasst. Hierbei konnten lediglich im OF signifikante Unterschiede zwischen epileptischen Tieren und den jeweiligen Kontrollgruppen festgestellt werden. Diese Unterschiede beziehen sich jedoch nur auf die Lokomotionsparameter (Abb. 17). Neben dem fehlenden Einfluss der Dauerstimulation und der daraus resultierenden spontanen Anfälle auf das angstassoziierte Verhalten der Tiere, konnte auch kein Einfluss von TRAM-34 auf die untersuchten Verhaltensparameter in diesen Paradigmen festgestellt werden. Eine erhöhte lokomotorische Aktivität konnte bereits in früheren Studien bei epileptischen Tieren nachgewiesen werden (BRANDT et al. 2006). Dabei wurde jedoch auch eine Abnahme des angstassoziierten Verhaltens bei epileptischen Tieren beobachtet, was in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden konnte. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Reduktion des angstassoziierten Verhaltens bei den epileptischen Tieren liefert die Aufenthaltsdauer der Kontrolltiere in den aversiven Bereichen. Sowohl im Versuchsaufbau der BWB als auch im EPM betrug diese mehr als 25% der Untersuchungsdauer (BWB: 26%, EPM: 46%). Überschreitet die Aufenthaltsdauer der Kontrolltiere in den aversiven Bereichen 25-30% der

Gesamtdauer des Verhaltenstests, verliert dieser dadurch seine Validität zur Beurteilung des angstassoziierten Verhaltens. Die Ergebnisse können somit nicht mehr zuverlässig interpretiert werden. Möglicherweise rührt die gesteigerte Aufenthaltsdauer der Kontrolltiere in den aversiven Bereichen von einer zu geringen Lichtintensität her, sodass diese als nicht aversiv empfunden werden und hieraus das Fehlen des angstassoziierten Verhaltens resultiert (CRAWLEY 2000). Die Ergebnisse aus dem OF deuten zudem auf das Vorliegen eines Hyperaktivitätssyndroms bei den epileptischen Tieren hin. Es handelt sich hierbei um ein bei humanen Epilepsiepatienten häufig auftretendes Syndrom (KONESKI u. CASELLA 2010; PARISI et al. 2010). Zum Zeitpunkt der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit liegen jedoch noch keine ausführlichen Untersuchungen zum Hyperaktivitätssyndrom bei Nagern im Epilepsiemodell vor. Diesbezüglich besteht weiterhin Forschungsbedarf, um in Zukunft eine bessere Interpretation der im Rahmen des Post-SE-Modelles auftretenden verhaltensassoziierten Veränderungen liefern zu können.

Um die kognitiven Fähigkeiten der Tiere zu beurteilen wurde der MWM-Test durchgeführt. Epileptische Ratten zeigen in diesem Paradigma normalerweise eine beeinträchtigte Lern- und Gedächtnisleistung (BRANDT et al. 2006; SEEGER et al. 2011). Im Rahmen dieser Dissertation zeigten die Tiere der verschiedenen Gruppen während der sechstägigen Akquisitionsphase keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Latenzzeit zum Auffinden der Plattform. Lediglich am ersten Tag konnte eine signifikant erhöhte Latenzzeit zwischen den mit TRAM-34 behandelten stimulierten Tieren und ihrer Kontrollgruppe festgestellt werden (Abb. 18). Die tatsächliche Lernleistung der Tiere zeigte sich schließlich in der *spatial probe*. Hierbei konnte das Ergebnis der 2006 und 2011 durchgeführten Studien bestätigt werden. Die epileptischen Tiere zeigten eine deutlich schlechtere Lernleistung als ihre jeweilige Kontrollgruppe (Abb. 19). Die Latenzzeit zum Auffinden der Plattform war signifikant erhöht und die Tiere kreuzten die ehemalige Plattformposition deutlich seltener als die jeweiligen Kontrolltiere. Lediglich die Aufenthaltsdauer der mit TRAM-34 behandelten epileptischen Tiere im dritten Quadranten glich der der zugehörigen Kontrollgruppe. Dies ist jedoch eher durch die signifikant verringerte Aufenthaltsdauer der Kontrolltiere in diesem Bereich im Vergleich zu den Kontrolltieren der anderen Gruppe zu erklären als durch eine Lernleistung seitens der epileptischen Tiere. Dennoch ist die Möglichkeit einer Lernleistung beider

behandelter Gruppen nicht auszuschließen. Es wäre immerhin denkbar, dass die Tiere beider Gruppen frühzeitig die Sinnlosigkeit einer Suche nach der Plattform erkannt haben. Ersteres ist jedoch aufgrund der übrigen Ergebnisse wahrscheinlicher. Die durch Post-SE-Modelle der TLE verursachte Schädigung im Bereich des Hippocampus wird für das schlechtere Abschneiden der stimulierten Tiere in diesem Test verantwortlich gemacht (STAFSTROM 2006). Der Grund für den fehlenden Effekt von TRAM-34 auf die Lern- und Gedächtnisleistung der Tiere ist somit möglicherweise auf zellulärer Ebene zu suchen. Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen im Post-SE-Modell stützen somit die Ergebnisse aus dem Amygdala-Kindling-Modell und deuten weiterhin auf ein Fehlen eines krankheitsmodifizierenden Effektes des in dieser Studie untersuchten calciumabhängigen Kaliumkanalblockers TRAM-34 hin.

Effekte von TRAM-34 auf zellulärer Ebene

Frühere Studien haben gezeigt, dass TLE zu morphologischen Veränderungen in den hippocampalen Strukturen führen kann (ENGEL 1996; PITKÄNEN u. SUTULA 2002). Hierzu zählen Neurodegeneration, Neurogenese, Axonen- sowie Dendritenwachstum sowie die Entwicklung einer Gliose. Einen neuen therapeutischen Ansatz für die selektive Modulation der Mikrogliafunktion, die zur Hemmung schädlicher Effekte unter gleichzeitiger Erhaltung der protektiven Eigenschaften wie beispielsweise der Phagozytose führt, bietet der im Rahmen dieser Studie untersuchte calciumabhängige Kaliumkanalblocker TRAM-34 (WULFF u. CASTLE 2010). Seine entzündungshemmende Wirkung und die damit einhergehenden neuroprotektiven Eigenschaften konnten bereits in zahlreichen Tiermodellen belegt werden (MAULER et al. 2004; KAUSHAL et al. 2007; BOUHY et al. 2011; CHEN et al. 2011). Aufgrund der existierenden Daten wurde nun in der vorliegenden Studie untersucht, ob durch TRAM-34 eine Beeinflussung epilepsieassoziiierter Veränderungen bezüglich der hippocampalen Neurodegeneration und Neurogenese stattfindet. Die Erfassung des Ausmaßes der Neurodegeneration fand sowohl im BLA-Kindling- als auch im Post-SE-Modell mittels eines Score-Systems statt. Analog zu früheren Daten (BRANDT et al. 2006) konnte im Post-SE-Modell eine signifikant höhere Neurodegeneration im Bereich der hippocampalen Formation sowie im parietalen und im piriformen Cortex bei den epileptischen Tieren im Vergleich zu ihrer jeweiligen Kontrollgruppe festgestellt

werden (Abb. 20 und Abb. 21). Entgegen der Ergebnisse der oben genannten Studien konnte jedoch in der CA₁- und der CA_{3a}-Region des Hippocampus eine Zunahme der neuronalen Zellverluste bei mit TRAM-34 behandelten epileptischen Ratten festgestellt werden (Abb. 20). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die unterschiedliche Art des Gehirninsultes sowie die unterschiedlichen betroffenen Gehirnregionen in den zu vergleichenden Studien sein. Es könnte dabei von entscheidender Bedeutung sein, welche Rolle Entzündungsprozesse und folglich die Mikrogliaaktivierung beim neuronalen Zelltod in den betroffenen Regionen spielen. Sowohl im Ischämie-Modell als auch im Post-SE-Modell kommt es zu Glutamat-vermittelter Exzitotoxizität und infolge dessen zu neuronalem Zellverlust. Dieser ist in beiden Modellen sowohl Folge von Nekrose als auch Apoptose (TAOUFIK u. PROBERT 2008; CHUANG 2010). Da es sich in beiden Modellen also um dieselben Grundmechanismen des Zelltodes handelt, bleibt zu überlegen, inwieweit die Art der Gehirnschädigung eine Rolle am Ausmaß des neuronalen Zellverlustes und eventuell assoziierten Signalwegen spielt. Möglicherweise ist das Ausmaß der neuronalen Schädigung stark von der betroffenen Gehirnregion und den hier unterschiedlich ablaufenden Signalkaskaden abhängig. Hierbei ist zu beachten, dass wir keinen nachteiligen Effekt durch die Blockade des KCa3.1-Kanals auf den piriformen Cortex beobachten konnten. Dies ist insofern von Relevanz, da der piriforme Cortex eine sensible Region für den SE induzierten neuronalen Zellverlust darstellt (FUJIKAWA et al. 2000). Um verlässliche Schlüsse aus diesen Daten zu ziehen, bedarf es jedoch weiterer Überlegungen bezüglich des Zusammenhangs der verschiedenen Funktionsstadien der Mikroglia und Neurodegeneration bzw. Neuroprotektion. Einerseits kann Mikroglia neurotoxische Zytokine, reaktive Sauerstoffspezies sowie NO freisetzen, andererseits kann Mikroglia jedoch auch neuroprotektive Eigenschaften besitzen und trophische Faktoren wie Zytokine, Antioxidantien, Neurotrophine sowie lysosomale Enzyme freisetzen (POLAZZI u. MONTI 2010; KETTENMANN et al. 2011). Folglich können Unterschiede in molekularen und zellulären pathophysiologischen Mechanismen, wie die durch beispielsweise Mikrogliazellen hervorgerufenen zellulären Signalwege, zu den gegensätzlichen Reaktionen auf TRAM-34 im ischämischen Hirnschlagmodell und dem Post-SE-Modell beigetragen haben und für das Fehlen eines neuroprotektiven Effektes in diesem Modell verantwortlich sein. Im Kindling-Modell der vorliegenden Studie konnte zwischen den einzelnen Tiergruppen kein Unterschied bezüglich der

Neurodegeneration festgestellt werden (Abb. 16). Dieses Ergebnis deckt sich jedoch mit Daten früherer Studien (BRANDT et al. 2004). Die Erfassung des Ausmaßes der Neurodegeneration anhand des oben erwähnten Score-Systems erfolgte allein aufgrund der Anwendung des *Massive* Kindling-Paradigmas. Eine bei gekindelten Tieren verstärkt auftretende Neurodegeneration infolge der häufigen und massiven Anfälle innerhalb eines kurzen Zeitraums konnte im Vorfeld nicht ausgeschlossen werden. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

Frühere Studien konnten zeigen, dass TRAM-34 die Mikrogliaaktivierung beeinflusst (KAUSHAL et al. 2007; CHEN et al. 2011; MAEZAWA et al. 2011). Die förderliche Phagozytoseaktivität der Mikrogliazellen bleibt dabei von der Blockade des KCa3.1-Kanals unberührt (KAUSHAL et al. 2007). Grund hierfür könnte die Beobachtung liefern, dass der Calciumeinstrom während der Phagozytoseaktivität durch entgegengesetzten Natrium-Calcium-Austausch mediert zu sein scheint (NEWELL et al. 2007) und nicht durch KCa3.1 regulierte CRAC-Kanäle. Aufgrund dieser Daten wurde im Rahmen dieser Studie untersucht, ob TRAM-34 einen Langzeit-Effekt auf die Aktivierung der Mikrogliazellen besitzt. Im Post-SE-Modell konnte 15 Wochen nach Induktion des SSSE in verschiedenen Regionen des Hippocampus ein Anstieg der aktivierten Mikrogliazellen festgestellt werden (Abb. 23). Ein Langzeiteffekt der Behandlung mit TRAM-34 auf die ED1-positiven Mikrogliazellen konnte hierbei jedoch nicht festgesellt werden. Diese Ergebnisse reflektieren das bei der Untersuchung der Neurodegeneration gewonnene Bild, wobei die vermehrte Neurodegeneration bei den stimulierten Tieren mit einer verstärkten Mikrogliaaktivierung einherzugehen scheint. Die bei mit TRAM-34 behandelten, epileptischen Tieren in einigen Regionen des Hippocampus verstärkt aufgetretene Neurodegeneration spiegelt sich jedoch nicht in der Anzahl der aktivierten Mikrogliazellen wider. Im Amygdala-Kindling-Modell konnte analog zur Untersuchung der Neurodegeneration kein Unterschied zwischen den Tiergruppen bezüglich der Anzahl der ED1-positiven Mikrogliazellen festgestellt werden. Dies unterstützt die Vermutung, dass die Anzahl der aktivierten Mikrogliazellen im direkten Zusammenhang zum neuronalen Zellverlust steht.

Eine weitere Hypothese dieser Arbeit war, dass eine Behandlung mit TRAM-34 die Produktion bzw. Sezernierung proinflammatorischer Zytokine senkt und auf diesem Weg zur Neuroprotektion führt. Grund zu der Annahme gaben frühere Studien, bei denen eine Reduktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-1 β durch

TRAM-34 erreicht werden konnte (REICH et al. 2005; BOUHY et al. 2011). Im Rahmen der durchgeführten Studie ließen sich jedoch weder im Post-SE-Modell noch im Kindling-Modell Unterschiede zwischen den Tiergruppen feststellen. Das Fehlen einer erhöhten Menge an TNF- α im Kindling-Modell scheint aufgrund der übrigen gewonnenen Daten nicht überraschend. Wenn keine erhöhte Mikrogliaaktivierung festzustellen ist, ist auch nicht mit einer vermehrten Zytokinsynthese zu rechnen. Anders verhält es sich jedoch im Post-SE-Modell. Aufgrund der bei den stimulierten Tieren erhöhten Mikrogliaaktivierung wäre ein Anstieg in der Zytokinproduktion bzw. der Menge der sezernierten Zytokine wie beispielsweise TNF- α zu erwarten. Eine mögliche Erklärung bietet die hier angewendete Methode der Immunhistochemie. Eventuell war sie in diesem Fall nicht sensitiv genug, um eine Veränderung des Expressionslevels von TNF- α zuverlässig darzustellen. Ein möglicher Effekt von TRAM-34 auf die Produktion und Sezernierung anderer proinflammatorischer Zytokine kann weiterhin nicht sicher ausgeschlossen werden. Es werden also weitere Studien nötig sein, um die Wirkung von TRAM-34 auf die Zytokinsynthese aktivierter Mikroglia näher zu untersuchen. An dieser Stelle soll betont werden, dass im Rahmen dieser Studie lediglich Langzeiteffekte von TRAM-34 auf die Zytokinsynthese ausgeschlossen werden können. Das Intervall zwischen dem Absetzen von TRAM-34 und der immunhistologischen Untersuchung betrug hierbei etwa elf Wochen. Eine weitere Studie ist also nötig, um den Effekt von TRAM-34 auf zellulärer Ebene direkt nach Absetzen oder sogar während der Applikation von TRAM-34 zu untersuchen.

Bekanntermaßen führt ein SE zu einer gesteigerten Zellproliferation sowie einer erhöhten Anzahl neugebildeter Neurone in den ersten Tagen nach selbigem (PARENT u. MURPHY 2008; SCHARFMAN u. MCCLOSKEY 2009). Im Rahmen dieser Studie wurde lediglich im Post-SE-Modell der Einfluss von TRAM-34 auf die akute Neurogenese untersucht. Diese beschreibt die Zellproliferation, die neuronale Differenzierung sowie das Überleben derjenigen Neurone, die in den ersten neun Tagen nach Induktion des SSSE gebildet wurden. Wie erwartet war die Anzahl an neugebildeten Zellen im GD der hippocampalen Formation bei den stimulierten Tieren im Vergleich zu ihrer jeweiligen Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die Anzahl neugebildeter Neurone in dieser Region war hingegen lediglich bei den mit TRAM-34 behandelten stimulierten Tieren im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe signifikant erhöht, sodass eine durch den SE hervorgerufene erhöhte Neurogenese nicht

bestätigt werden konnte. Das Fehlen eines signifikanten Unterschiedes zwischen den beiden stimulierten Gruppen hinsichtlich der Neurogenese spricht gegen einen bemerkenswerten Einfluss von TRAM-34 auf die hippocampale Neurogenese während der Epileptogenese. Aufgrund der ungewöhnlich hohen Zellzahlen im Hilus des Hippocampus besteht eine Unsicherheit, ob die im Bereich des GD erhobenen Daten vollständig valide sind. Eine erneute Quantifizierung der BrdU- sowie der BrdU/NeuN-positiven Zellen sowie eine Überprüfung der Validität der Färbung selbst sind geplant, um die Richtigkeit der Ergebnisse bezüglich der Neurogenese zu bestätigen. Zum Zeitpunkt der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit sind diese jedoch noch ausstehend.

Schlussbetrachtungen

Abschließend bleibt zu klären, ob das Konzept der Entzündungshemmung wirklich geeignet ist, um die Epileptogenese zu verhindern oder zumindest krankheitsmodifizierend einzugreifen. In früheren Studien wurden bereits zahlreiche antiinflammatorische Strategien zur Beeinflussung der Epileptogenese in verschiedenen Epilepsiemodellen untersucht. Hierbei kamen unter anderen nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs), antiinflammatorische Zytokine sowie Blocker der proinflammatorischen Zytokine und Immunsuppressiva zum Einsatz (RAVIZZA et al. 2011). Die verwendeten Wirkstoffe zielen jeweils auf ein anderes Target ab, sodass eine Entzündungshemmung über verschiedene Mechanismen erreicht werden kann. Über den Erfolg der antiinflammatorischen Strategien existieren jedoch kontroverse Daten (RAVIZZA et al. 2011). So ist dieser vermutlich abhängig vom Zeitpunkt des Beginns der Behandlung mit dem jeweiligen Wirkstoff, sowie der Dauer und der Art des initialen Gehirninsultes. Beispielsweise wurden in früheren Studien verschiedene Cyclooxygenase (COX)-2-Hemmer auf ihre antiepileptogene sowie neuroprotektive Wirkung untersucht. Hierbei konnten entweder neuroprotektive Effekte sowie eine Reduktion der Häufigkeit und Dauer der Anfallsaktivität (JUNG et al. 2006; POLASCHECK et al. 2010), oder keine krankheitsmodifizierenden oder neuroprotektiven Effekte nachgewiesen werden (HOLTMAN et al. 2009). Der Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse ist wahrscheinlich in der Länge der initialen Gehirnschädigung zu suchen (LOSCHER 2012). Dennoch lässt sich die Möglichkeit einer Beeinflussung der Epileptogenese durch antiinflammatorische Strategien nicht ausschließen. Der in der vorliegenden

Arbeit verwendete Kaliumkanalblocker TRAM-34 führt über die Hemmung des intrazellulären Calciumanstieges zu einer verminderten Produktion proinflammatorischer Zytokine und NO sowie zu einer Hemmung des oxidativen *Burst*-Verhaltens (KHANNA et al. 2001; KAUSHAL et al. 2007). Gleichzeitig bleibt jedoch die Phagozytoseaktivität der Mikrogliazellen erhalten, da diese nicht durch KCa3.1 regulierte CRAC-Kanäle mediert zu sein scheint (NEWELL et al. 2007). Es wäre also zu erwarten, dass eine Behandlung mit TRAM-34 während der Epileptogenese zu einer verminderten Freisetzung proinflammatorischer Substanzen bei gleichzeitiger Erhaltung neuroprotektiver Eigenschaften, wie der Phagozytose, führt. Die nach einem Gehirnschlag freigesetzten Entzündungsfaktoren können die Übererregbarkeit der Neurone im Zuge der Epileptogenese fördern, gleichzeitig kann das Vorhandensein eines übererregbaren neuronalen Netzwerkes jedoch auch die Entzündungsreaktionen fördern (DEVINSKY et al. 2013a). Es ist also nicht auszuschließen, dass eine Modulation der Mikrogliaaktivierung durch TRAM-34 primär eine verminderte Entzündungsreaktion zur Folge hat, diese aber aufgrund des fehlenden antiepileptogenen Effektes durch die vorhandene Anfallsaktivität weiter getriggert wird. Mögliche neuroprotektive Wirkungen sowie Effekte von TRAM-34 auf verhaltensassoziierte Komorbiditäten und die Kognition würden in diesem Fall unerkant bleiben.

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob in der vorliegenden Studie die richtigen Dosierungen verwendet wurden, um einen antiinflammatorischen Effekt zu erzielen. Diese entsprachen denselben Dosierungen, wie sie auch im Ischämie-Modell verwendet wurden (CHEN et al. 2011). In diesem Modell konnten durch die verwendeten Dosierungen sowohl das Ausmaß des Infarktes als auch neurologische Defizite bei Ratten reduzieren. Da es sich hierbei jedoch um zwei verschiedene Modelle mit unterschiedlichen pathophysiologischen Mechanismen bezüglich der Hirnschädigung handelt, kann eine bereits erfolgreich erprobte Dosierung einer Substanz nicht zwingend ohne Weiteres auf das andere Modell übertragen werden. Es ist also möglich, dass im Post-SE-Modell eine geringere oder höhere Dosierung von TRAM-34 notwendig gewesen wäre, um antiinflammatorische und somit neuroprotektive Effekte zu entfalten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die in zwei unterschiedlichen chronischen Epilepsiemodellen gewonnenen Daten gegen eine Tauglichkeit von TRAM-34 als erkrankungsmodifizierende oder antiepileptogene Substanz sprechen. Die

fehlende Beeinflussung der Iktogenese sowie der Epileptogenese in chronischen Epilepsiemodellen könnte vom fehlenden positiven Effekt auf zellulärer Ebene herrühren. Der erhöhte Neuronenverlust in mit TRAM-34 behandelten Tieren spricht zudem dafür, dass das Auftreten TRAM-34-vermittelter neuroprotektiver Wirkungen von den beteiligten pathophysiologischen Mechanismen der jeweiligen Hirnschädigung abhängt. Um diese Wirkungsmechanismen besser zu verstehen und das therapeutische sowie prophylaktische Potenzial von TRAM-34 für andere neuropathologische Geschehen zu evaluieren, werden in Zukunft weitere Studien nötig sein. Das Fehlen antiepileptogener sowie relevanter krankheitsmodifizierender Effekte von TRAM-34 im Rahmen der vorliegenden Studie schließt jedoch die Möglichkeit der Beeinflussung der Epileptogenese durch Entzündungshemmung nicht aus.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Tanja Ongerth

Untersuchung erkrankungsmodifizierender und antiepileptogener Effekte eines Blockers des Kaliumkanals KCa3.1 in chronischen Epilepsiemodellen

Epilepsien gehören sowohl bei Hund und Katze, als auch beim Menschen zu den häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS). Der Erkrankung liegen häufig genetische Defekte oder strukturelle und metabolische Ursachen zugrunde. Die lebenslange Pharmakotherapie stellt bis heute die Therapie der Wahl dar. Bei rund einem Drittel der Veterinär- und Humanpatienten kann jedoch keine vollständige Anfallskontrolle durch auf dem Markt befindliche Pharmaka erzielt werden. Ihnen bleibt nur eine chirurgische Resektion des betroffenen Hirnareals, wobei auch hier zusätzlich eine lebenslange medikamentöse Therapie nötig ist, oder ein Leben mit unkontrollierten epileptischen Anfällen. Dieses ist meist mit einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität durch Stigmatisierung, ein erhöhtes Verletzungsrisiko oder plötzliche Todesfälle verbunden. In der Veterinärmedizin stellen die Nebenwirkungen der verabreichten Antiepileptika (AEs) und die erhebliche Belastung für die Patientenbesitzer ein großes Problem dar, sodass in einigen Fällen sogar eine Euthanasie nötig wird. Heute zugelassene AEs zielen zudem lediglich auf eine Anfallsfreiheit ab, haben jedoch keine Wirkung auf die Epileptogenese sowie die zugrundeliegende Ursache. Die Untersuchung der Beteiligung von Neuronen, Ionenkanälen, Transportern sowie exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmission stellte bislang den experimentellen Fokus dar. Der Effekt von gängigen AEs auf Gliazellen und das Immunsystem wurde dabei bisher weitgehend vernachlässigt. Die Daten zahlreicher früherer Studien deuten jedoch auf eine Beteiligung der Entzündungsprozesse im ZNS an der Epileptogenese sowie der Pharmakoresistenz eines großen Teils der Patienten hin. Antiinflammatorische oder immunsuppressive Therapien führten dabei bei einigen Formen der Epilepsie zur Anfallskontrolle ansonsten pharmakoresistenter Patienten. Die entzündungshemmende Behandlung stellt somit neben der Neuroprotektion und der Modulation neuronaler Hyperexzitabilität eine bedeutende und hoffnungsvolle neue Strategie zur Modulation der Epileptogenese sowie der damit assoziierten psychiatrischen Komorbiditäten dar. Zahlreiche Studien der letzten Jahre deuten auf eine maßgebliche Beteiligung aktivierter Mikrogliazellen an inflammatorischen

Prozessen im ZNS hin. Eine besondere Bedeutung bei der Aktivierung der Mikroglia besitzt der calciumabhängige Kaliumkanal KCa3.1. Durch Hemmung dieses Kanals könnte demzufolge eine Modulation der Mikrogliaaktivierung erreicht werden. Die Blockade von KCa3.1 stellt daher einen vielversprechenden Ansatzpunkt zur Entzündungshemmung dar. Der im Rahmen dieser Studie verwendete selektive Blocker Triarylmethan-34 (TRAM-34) konnte bereits in zahlreichen früheren Untersuchungen Entzündungsprozesse im Gehirn verringern und somit seine neuroprotektiven Eigenschaften unter Beweis stellen. Eine Prophylaxe der Epilepsie wäre das oberste Ziel einer Behandlung mit TRAM-34. Eine Reduzierung des Schweregrades oder der Häufigkeit der Anfälle wäre jedoch auch sehr erstrebenswert.

Daher wurde der Effekt von TRAM-34 auf die Iktogenese sowie die Epileptogenese in zwei chronischen Epilepsiemodellen untersucht. Im Amygdala-Kindling-Modell wurden verschiedene Dosierungen und Vorbehandlungszeiten mit TRAM-34 getestet. Hierbei konnte kein akuter Effekt auf die Anfallsparameter und somit auf die Iktogenese festgestellt werden. Im *Massive* Kindling-Paradigma wurde anschließend der Einfluss von TRAM-34 auf die subchronische Phase der Epilepsieentstehung untersucht. Auch hierbei konnte kein Effekt der Substanz auf die untersuchten Anfallsparameter festgestellt werden. Ein antiepileptogener Effekt von TRAM-34 scheint folglich unwahrscheinlich. Des Weiteren konnte durch TRAM-34 keine Steigerung der Effizienz des Standardepileptikums Phenobarbital nach wiederholten Anfällen erzielt werden. Eine schnellere Metabolisierung von Phenobarbital durch die Gabe von TRAM-34 ist aufgrund des Blutplasmaspiegels, welcher sich im subtherapeutischen Bereich befand, jedoch unwahrscheinlich. Auch im *Post-Status-Epilepticus* (SE)-Modell konnte weder ein Einfluss von TRAM-34 auf die Entwicklung spontaner Anfälle, noch auf verhaltensassoziierte Veränderungen oder die Kognition beobachtet werden. Auf zellulärer Ebene konnte durch histologische sowie immunhistochemische Untersuchung im Amygdala-Kindling-Modell kein Unterschied zwischen den jeweiligen Gruppen festgestellt werden. Untersuchungen im Post-SE-Modell konnten den in früheren Studien nachgewiesenen neuroprotektiven Effekt von TRAM-34 nicht bestätigen. Die Behandlung mit TRAM-34 führte sogar zu einer Zunahme der neurodegenerativen Veränderungen in einigen Bereichen des Hippocampus. Eine entsprechend erhöhte Neurogenese konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Auch die Mikrogliaaktivierung war in diesem Bereich bei mit

TRAM-34 behandelten epileptischen Tieren nicht signifikant höher als bei entsprechenden Tieren, die Vehikellösung bekommen hatten. Zudem konnte in der vorliegenden Studie keine erhöhte Zytokinsynthese bei epileptischen Tieren festgestellt werden. Diese wurde folglich auch nicht von TRAM-34 beeinflusst.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die im Rahmen dieser Studie gewonnenen Daten eher gegen einen neuroprotektiven Effekt von TRAM-34, sowie einen eventuellen krankheitsmodifizierenden Einfluss sprechen. Die unterschiedlichen Ergebnisse in Bezug auf die neuroprotektive Wirkung von TRAM-34 im Vergleich zu Daten aus früheren Studien könnten auf die unterschiedliche Art des Gehirninsultes in den verschiedenen Modellen zurückzuführen sein, sodass sich TRAM-34 nicht bei jeder Form des Gehirninsultes als antiinflammatorische Substanz einsetzen lässt. Demzufolge wären weitere Untersuchungen notwendig, um die in den unterschiedlichen Modellen ablaufenden pathophysiologischen Mechanismen besser zu verstehen.

VIII. SUMMARY

Tanja Ongerth

Evaluation of the disease-modifying and antiepileptogenic effects of a blocker of the potassium channel KCa3.1 in chronic epilepsy models

Epilepsies are amongst the most common chronic neurological diseases of the central nervous system (CNS) in dogs, cats and humans alike. Their origin is often a genetic defect or a structural or metabolic cause. A lifelong pharmacological therapy is still the current treatment of choice. Yet, in about one third of the veterinary and human patients, complete seizure control can not be achieved through currently available antiepileptic drugs (AED). The remaining options are a surgical resection of the affected brain area, combined with a lifelong drug therapy, or a life with uncontrolled seizures. The latter is usually associated with a substantial reduction in quality of life through stigmatization, increased risk of injury or sudden death. In veterinary medicine, the main problems are the adverse effects of the AEDs and the great burden for patient owners, which make euthanasia necessary in some cases. Additionally, today's available and approved AEDs mainly aim to achieve freedom from seizures, yet they have no effect on the epileptogenesis and the underlying cause. The evaluation of the involvement of neurons, ion-channels, transporters, as well as excitatory and inhibitory neurotransmission is still the main focus in research. The effect of common AEDs on glial cells and the immune system has been largely neglected. Previous studies suggest an involvement of neuroinflammation in epileptogenesis as well as in drug resistance of a large proportion of patients. In some forms of epilepsy, anti-inflammatory or immunosuppressive therapies have led to seizure control in otherwise drug-resistant patients. The anti-inflammatory treatment is, in addition to neuroprotection and the modulation of neuronal hyperexcitability, one of the most important and promising new strategies for modulation of epileptogenesis and their associated psychiatric comorbidities. Numerous studies of the past years indicate a high level of participation of activated microglia in inflammatory processes in the CNS. The calcium-dependent potassium channel KCa3.1 plays a key role in the activation of microglia. The inhibition of this channel could therefore result in a modulation of microglial activation and present itself as a promising starting point for the inhibition of inflammation. The blocker used in the present study is triaryl methane-34 (TRAM-34). In previous studies this

pharmacological tool has achieved promising results in the reduction of inflammation in the CNS and has been able to demonstrate its associated neuroprotective properties. Prophylaxis of epilepsy would be the foremost goal of treatment with TRAM-34. A reduction in the seizure severity or seizure frequency would also be highly desirable.

Therefore, we studied the effect of TRAM 34 on ictogenesis and epileptogenesis in two models of chronic epilepsy. In the amygdala kindling model different dosages and treatment times were tested with TRAM-34. In this model no effects on seizure threshold and on seizure parameters, and thus on ictogenesis could be shown. In the massive kindling paradigm the influence of TRAM-34 on the sub-chronic phase of epileptogenesis was investigated. In this regard too, no effects of the compound on the seizure parameters could be observed. For this reason, an antiepileptogenic effect of TRAM-34 is very unlikely. Additionally, the efficacy of the standard-AED phenobarbital after repeated seizures could not be improved by administration of TRAM-34. However, a faster metabolism of phenobarbital by administration of TRAM-34 is unlikely regarding its plasma concentration. Effects of TRAM-34 could also not be shown in the post-status-epilepticus (SE)-model, regarding the development of spontaneous seizures, the behavior-associated changes or cognition. In the amygdala-kindling model, histological as well as immunohistochemical analyses did not confirm an effect of the compound on the cellular level, since no significant differences could be observed between the different groups. Our studies within the frame of the post-SE-model could also not confirm the in previous studies proclaimed neuroprotective effect of TRAM-34. The treatment with TRAM-34 even lead to exacerbation of neurodegenerative changes in some areas of the hippocampus. An increased neurogenesis could however not be proven. In addition, the microglial activation in this area was not significantly higher in epileptic animals treated with TRAM-34, compared to the corresponding vehicle control group. Furthermore, in the present study no increased synthesis of cytokines could be measured in epileptic animals and was therefore not influenced by the administration of TRAM-34.

In summary, the results gained in this study rather argue against any neuroprotective and disease-modifying effect of TRAM-34. The different results regarding neuroprotective effects of TRAM-34 compared to the data obtained in earlier studies might be due to the varying kinds of brain insults constituted in the different models.

This means, that TRAM-34 cannot be used as an anti-inflammatory compound for every type of brain insult, but its usefulness depends on the underlying pathophysiological mechanisms. Further studies would be necessary, for a better understanding of the pathophysiological mechanisms that take place in the different models

IX. LITERATURVERZEICHNIS

AL-GHANANEEM, A. M., M. ABBASSI, S. SHRESTHA, G. RAMAN, H. WULFF, L. PEREIRA u. A. ANSARI (2010):

Formulation-based approach to support early drug discovery and development efforts: a case study with enteric microencapsulation dosage form development for a triarylmethane derivative TRAM-34; a novel potential immunosuppressant.

Drug development and industrial pharmacy 36, 563-569

ALTMAN, J. (1969):

Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb.

The Journal of comparative neurology 137, 433-457

ALTMAN, J. u. G. D. DAS (1965):

Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats.

The Journal of comparative neurology 124, 319-335

ASHEUER, M., F. PFLUMIO, S. BENHAMIDA, A. DUBART-KUPPERSCHMITT, F. FOUQUET, Y. IMAI, P. AUBOURG u. N. CARTIER (2004):

Human CD34+ cells differentiate into microglia and express recombinant therapeutic protein.

Proc Natl Acad Sci U S A 101, 3557-3562

BAKER, G. A., A. JACOBY, D. BUCK, C. STALGIS u. D. MONNET (1997):

Quality of life of people with epilepsy: a European study.

Epilepsia 38, 353-362

BANNERMAN, D. M., B. K. YEE, M. A. GOOD, M. J. HEUPEL, S. D. IVERSEN u. J. N. RAWLINS (1999):

Double dissociation of function within the hippocampus: a comparison of dorsal, ventral, and complete hippocampal cytotoxic lesions.

Behavioral neuroscience 113, 1170-1188

BASTOS, G. N., T. MORIYA, F. INUI, T. KATURA u. N. NAKAHATA (2008):

Involvement of cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced impairment of the newborn cell survival in the adult mouse dentate gyrus.

Neuroscience 155, 454-462

BATTISTA, D., C. C. FERRARI, F. H. GAGE u. F. J. PITOSI (2006):

Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus.

The European journal of neuroscience 23, 83-93

BAUMGARTNER, C. (2001):

Handbuch der Epilepsien: Klinik, Diagnostik, Therapie und psychosoziale Aspekte. Springer-Verlag Wien

BEGHI, E. (2009):

Accidents and injuries in patients with epilepsy.
Expert Rev Neurother 9, 291-298

BELARBI, K., C. ARELLANO, R. FERGUSON, T. JOPSON u. S. ROSI (2012):
Chronic neuroinflammation impacts the recruitment of adult-born neurons into
behaviorally relevant hippocampal networks.
Brain, behavior, and immunity 26, 18-23

BEN-ARI, Y., E. TREMBLAY, D. RICHE, G. GHILINI u. R. NAQUET (1981):
Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration
of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose
method with special reference to the pathology of epilepsy.
Neuroscience 6, 1361-1391

BENGZON, J., Z. KOKAIA, E. ELMER, A. NANOBASHVILI, M. KOKAIA u. O.
LINDVALL (1997):
Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent
limbic seizures.
Proc Natl Acad Sci U S A 94, 10432-10437

BERG, A. T., S. F. BERKOVIC, M. J. BRODIE, J. BUCHHALTER, J. H. CROSS, W.
VAN EMDE BOAS, J. ENGEL, J. FRENCH, T. A. GLAUSER, G. W. MATHERN, S. L.
MOSHE, D. NORDLI, P. PLOUIN u. I. E. SCHEFFER (2010):
Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report
of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009.
Epilepsia 51, 676-685

BERNIER, P. J., A. BEDARD, J. VINET, M. LEVESQUE u. A. PARENT (2002):
Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates.
Proc Natl Acad Sci U S A 99, 11464-11469

BIEBL, M., C. M. COOPER, J. WINKLER u. H. G. KUHN (2000):
Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing
capacity in the adult rat brain.
Neurosci Lett 291, 17-20

BLOCK, M. L., L. ZECCA u. J. S. HONG (2007):
Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms.
Nature reviews. Neuroscience 8, 57-69

BOER, K., W. G. SPLIET, P. C. VAN RIJEN, S. REDEKER, D. TROOST u. E.
ARONICA (2006):
Evidence of activated microglia in focal cortical dysplasia.
J Neuroimmunol 173, 188-195

BOUHY, D., N. GHASEMLOU, S. LIVELY, A. REDENSEK, K. I. RATHORE, L. C.
SCHLICHTER u. S. DAVID (2011):
Inhibition of the Ca(2)(+)-dependent K(+) channel, KCNN4/KCa3.1, improves tissue
protection and locomotor recovery after spinal cord injury.
J Neurosci 31, 16298-16308

- BRANDT, C., U. EBERT u. W. LOSCHER (2004):
Epilepsy induced by extended amygdala-kindling in rats: lack of clear association between development of spontaneous seizures and neuronal damage.
Epilepsy Res 62, 135-156
- BRANDT, C., A. M. GASTENS, M. SUN, M. HAUSKNECHT u. W. LOSCHER (2006):
Treatment with valproate after status epilepticus: effect on neuronal damage, epileptogenesis, and behavioral alterations in rats.
Neuropharmacology 51, 789-804
- BRANDT, C., M. GLIEN, H. POTSCHKA, H. VOLK u. W. LOSCHER (2003):
Epileptogenesis and neuropathology after different types of status epilepticus induced by prolonged electrical stimulation of the basolateral amygdala in rats.
Epilepsy Res 55, 83-103
- BRODIE, M. J., S. J. BARRY, G. A. BAMAGOUS, J. D. NORRIE u. P. KWAN (2012):
Patterns of treatment response in newly diagnosed epilepsy.
Neurology 78, 1548-1554
- BRUCE, A. J., W. BOLING, M. S. KINDY, J. PESCHON, P. J. KRAEMER, M. K. CARPENTER, F. W. HOLTSBERG u. M. P. MATTSON (1996):
Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors.
Nature medicine 2, 788-794
- BUCKMASTER, P. S., G. F. ZHANG u. R. YAMAWAKI (2002):
Axon sprouting in a model of temporal lobe epilepsy creates a predominantly excitatory feedback circuit.
J Neurosci 22, 6650-6658
- CACCI, E., M. A. AJMONE-CAT, T. ANELLI, S. BIAGIONI u. L. MINGHETTI (2008):
In vitro neuronal and glial differentiation from embryonic or adult neural precursor cells are differently affected by chronic or acute activation of microglia.
Glia 56, 412-425
- CAHALAN, M. D. u. K. G. CHANDY (2009):
The functional network of ion channels in T lymphocytes.
Immunological reviews 231, 59-87
- CAMERON, H. A. u. R. D. MCKAY (2001):
Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus.
The Journal of comparative neurology 435, 406-417
- CAMERON, H. A., C. S. WOOLLEY, B. S. MCEWEN u. E. GOULD (1993):
Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat.
Neuroscience 56, 337-344
- CARPIO, A. u. W. A. HAUSER (2009):
Epilepsy in the developing world.
Curr Neurol Neurosci Rep 9, 319-326

- CHAN, W. Y., S. KOHSAKA u. P. REZAIE (2007):
The origin and cell lineage of microglia: new concepts.
Brain research reviews 53, 344-354
- CHANG, B. S. u. D. H. LOWENSTEIN (2003):
Epilepsy.
N Engl J Med 349, 1257-1266
- CHANG, Y., D. J. MELLOR u. T. J. ANDERSON (2006):
Idiopathic epilepsy in dogs: owners' perspectives on management with phenobarbitone and/or potassium bromide.
The Journal of small animal practice 47, 574-581
- CHEN, Y. J., G. RAMAN, S. BODENDIEK, M. E. O'DONNELL u. H. WULFF (2011):
The KCa3.1 blocker TRAM-34 reduces infarction and neurological deficit in a rat model of ischemia/reperfusion stroke.
J Cereb Blood Flow Metab 31, 2363-2374
- CHRISTMAS, A. J. u. D. R. MAXWELL (1970):
A comparison of the effects of some benzodiazepines and other drugs on aggressive and exploratory behaviour in mice and rats.
Neuropharmacology 9, 17-29
- CHUANG, Y. C. (2010):
Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in seizure-induced neuronal cell death.
Acta neurologica Taiwanica 19, 3-15
- COLTON, C. A. (2009):
Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain.
Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology 4, 399-418
- COSTALL, B., B. J. JONES, M. E. KELLY, R. J. NAYLOR u. D. M. TOMKINS (1989):
Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety.
Pharmacology, biochemistry, and behavior 32, 777-785
- CRAWLEY, J. (2000):
What's wrong with my mouse? Behavioural phenotyping of transgenic and knockout mice.
John Wiley and Sons, Inc
- CRAWLEY, J. u. F. K. GOODWIN (1980):
Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines.
Pharmacology, biochemistry, and behavior 13, 167-170
- CRESPEL, A., V. RIGAU, P. COUBES, M. C. ROUSSET, F. DE BOCK, H. OKANO, M. BALDY-MOULINIER, J. BOCKAERT u. M. LERNER-NATOLI (2005):
Increased number of neural progenitors in human temporal lobe epilepsy.
Neurobiology of disease 19, 436-450
- CRUSE, G., S. M. DUFFY, C. E. BRIGHTLING u. P. BRADDING (2006):

Functional KCa3.1 K⁺ channels are required for human lung mast cell migration.
Thorax 61, 880-885

CUNHA, A. O., M. R. MORTARI, J. L. LIBERATO u. W. F. DOS SANTOS (2009):
Neuroprotective effects of diazepam, carbamazepine, phenytoin and ketamine after
pilocarpine-induced status epilepticus.
Basic & clinical pharmacology & toxicology 104, 470-477

CZECH, M., P. GRESSENS u. A. M. KAINDL (2011):
The yin and yang of microglia.
Developmental neuroscience 33, 199-209

D'AMBROSIO, R., C. L. EASTMAN, C. FATTORE u. E. PERUCCA (2013):
Novel frontiers in epilepsy treatments: preventing epileptogenesis by targeting
inflammation.
Expert Rev Neurother 13, 615-625

D'HOOGE, R. u. P. P. DE DEYN (2001):
Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory.
Brain research. Brain research reviews 36, 60-90

DALBY, N. O. u. I. MODY (2001):
The process of epileptogenesis: a pathophysiological approach.
Current opinion in neurology 14, 187-192

DASHTIPOUR, K., A. M. WONG, A. OBENAU, I. SPIGELMAN u. C. E. RIBAK
(2003):
Temporal profile of hilar basal dendrite formation on dentate granule cells after status
epilepticus.
Epilepsy Res 54, 141-151

DAVALOS, D., J. GRUTZENDLER, G. YANG, J. V. KIM, Y. ZUO, S. JUNG, D. R.
LITTMAN, M. L. DUSTIN u. W. B. GAN (2005):
ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo.
Nat Neurosci 8, 752-758

DE SIMONI, M. G., C. PEREGO, T. RAVIZZA, D. MONETA, M. CONTI, F.
MARCHESI, A. DE LUIGI, S. GARATTINI u. A. VEZZANI (2000):
Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by
limbic status epilepticus.
The European journal of neuroscience 12, 2623-2633

DEVINSKY, O., A. VEZZANI, S. NAJJAR, N. C. DE LANEROLLE u. M. A.
ROGAWSKI (2013a):
Glia and epilepsy: excitability and inflammation.
Trends Neurosci
DEVINSKY, O., A. VEZZANI, S. NAJJAR, N. C. DE LANEROLLE u. M. A.
ROGAWSKI (2013b):
Glia and epilepsy: excitability and inflammation.
Trends Neurosci 36, 174-184

DUBE, C. M., T. RAVIZZA, M. HAMAMURA, Q. ZHA, A. KEEBAUGH, K. FOK, A. L. ANDRES, O. NALCIOGLU, A. OBENAU, A. VEZZANI u. T. Z. BARAM (2010):
Epileptogenesis provoked by prolonged experimental febrile seizures: mechanisms and biomarkers.

J Neurosci 30, 7484-7494

DUDEK, F. E., J. L. HELLIER, P. A. WILLIAMS, D. J. FERRARO u. K. J. STALEY (2002):

The course of cellular alterations associated with the development of spontaneous seizures after status epilepticus.

Progress in brain research 135, 53-65

DUPONT, S. (2009):

Crespel A.[Status epilepticus: Epidemiology, definitions and classifications.].

Rev Neurol (Paris)

EKDAHL, C. T., J. H. CLAASEN, S. BONDE, Z. KOKAIA u. O. LINDVALL (2003):

Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain.

Proc Natl Acad Sci U S A 100, 13632-13637

ENGEL, J., JR. (1996):

Clinical evidence for the progressive nature of epilepsy.

Epilepsy research. Supplement 12, 9-20

ENGEL, T., C. K. SCHINDLER, A. SANZ-RODRIGUEZ, R. M. CONROY, R. MELLER, R. P. SIMON u. D. C. HENSHALL (2011):

Expression of neurogenesis genes in human temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis.

International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology 3, 38-47

ERIKSSON, P. S., E. PERFILIEVA, T. BJORK-ERIKSSON, A. M. ALBORN, C. NORDBORG, D. A. PETERSON u. F. H. GAGE (1998):

Neurogenesis in the adult human hippocampus.

Nature medicine 4, 1313-1317

FANG, M., Z. Q. XI, Y. WU u. X. F. WANG (2011):

A new hypothesis of drug refractory epilepsy: neural network hypothesis.

Medical hypotheses 76, 871-876

FISHER, P. D., E. F. SPERBER u. S. L. MOSHE (1998):

Hippocampal sclerosis revisited.

Brain Dev 20, 563-573

FISHER, R. S., W. VAN EMDE BOAS, W. BLUME, C. ELGER, P. GENTON, P. LEE u. J. ENGEL, JR. (2005):

Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE).

Epilepsia 46, 470-472

FOLDVARY, N., W. E. BINGAMAN u. E. WYLLIE (2001):

Surgical treatment of epilepsy.

Neurologic clinics 19, 491-515

- FUJIKAWA, D. G., H. H. ITABASHI, A. WU u. S. S. SHINMEI (2000):
Status epilepticus-induced neuronal loss in humans without systemic complications or epilepsy.
Epilepsia 41, 981-991
- FUJIOKA, H. u. T. AKEMA (2010):
Lipopolysaccharide acutely inhibits proliferation of neural precursor cells in the dentate gyrus in adult rats.
Brain research 1352, 35-42
- GAGE, F. H. (2002):
Neurogenesis in the adult brain.
J Neurosci 22, 612-613
- GAGE, F. H., G. KEMPERMANN, T. D. PALMER, D. A. PETERSON u. J. RAY (1998):
Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus.
Journal of neurobiology 36, 249-266
- GALIC, M. A., K. RIAZI u. Q. J. PITTMAN (2012):
Cytokines and brain excitability.
Frontiers in neuroendocrinology 33, 116-125
- GHANSHANI, S., H. WULFF, M. J. MILLER, H. ROHM, A. NEBEN, G. A. GUTMAN, M. D. CAHALAN u. K. G. CHANDY (2000):
Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences.
The Journal of biological chemistry 275, 37137-37149
- GILLIAM, F. G. u. B. ALBERTSON (2011):
Identifying epilepsy surgery candidates in the outpatient clinic.
Epilepsy Behav 20, 156-159
- GODDARD, G. V. (1969):
Analysis of avoidance conditioning following cholinergic stimulation of amygdala in rats.
Journal of comparative and physiological psychology 68, 1-18
- GODDARD, G. V., D. C. MCINTYRE u. C. K. LEECH (1969):
A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation.
Exp Neurol 25, 295-330
- GORDON, S. (2003):
Alternative activation of macrophages.
Nat Rev Immunol 3, 23-35
- GORTER, J. A., E. A. VAN VLIET, E. ARONICA u. F. H. LOPES DA SILVA (2001):
Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fibre sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and somatostatin-immunoreactive neurons.

The European journal of neuroscience 13, 657-669

GOULD, E. (2007):

How widespread is adult neurogenesis in mammals?

Nature reviews. Neuroscience 8, 481-488

GOULD, E., A. J. REEVES, M. S. GRAZIANO u. C. G. GROSS (1999):

Neurogenesis in the neocortex of adult primates.

Science 286, 548-552

GRAEBER, M. B. u. W. J. STREIT (2010):

Microglia: biology and pathology.

Acta Neuropathol 119, 89-105

GREEN, H. F., E. TREACY, A. K. KEOHANE, A. M. SULLIVAN, G. W. O'KEEFFE u. Y. M. NOLAN (2012):

A role for interleukin-1beta in determining the lineage fate of embryonic rat hippocampal neural precursor cells.

Molecular and cellular neurosciences 49, 311-321

GUNDERSEN, H. J., P. BAGGER, T. F. BENDTSEN, S. M. EVANS, L. KORBO, N. MARCUSSEN, A. MOLLER, K. NIELSEN, J. R. NYENGAARD, B. PAKKENBERG u. ET AL. (1988):

The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis.

APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica 96, 857-881

HALL, C. S. (1934):

Emotional behavior in the rat I Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality.

J Comp Psychol 18, 385-403

HALONEN, T., J. NISSINEN u. A. PITKANEN (2001):

Chronic elevation of brain GABA levels beginning two days after status epilepticus does not prevent epileptogenesis in rats.

Neuropharmacology 40, 536-550

HANISCH, U. K. u. H. KETTENMANN (2007):

Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain.

Nat Neurosci 10, 1387-1394

HASTINGS, N. B. u. E. GOULD (1999):

Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells.

The Journal of comparative neurology 413, 146-154

HATTIANGADY, B., M. S. RAO u. A. K. SHETTY (2004):

Chronic temporal lobe epilepsy is associated with severely declined dentate neurogenesis in the adult hippocampus.

Neurobiology of disease 17, 473-490

- HENSHALL, D. C. u. R. P. SIMON (2005):
Epilepsy and apoptosis pathways.
J Cereb Blood Flow Metab 25, 1557-1572
- HERMAN, S. T. (2002):
Epilepsy after brain insult: targeting epileptogenesis.
Neurology 59, S21-26
- HODGES, H. (1996):
Maze procedures: the radial-arm and water maze compared.
Brain research. Cognitive brain research 3, 167-181
- HOFER, S., D. GRANDGIRARD, D. BURRI, T. K. FROHLICH u. S. L. LEIB (2011):
Bacterial meningitis impairs hippocampal neurogenesis.
Journal of neuropathology and experimental neurology 70, 890-899
- HOLTMAN, L., E. A. VAN VLIET, R. VAN SCHAIK, C. M. QUEIROZ, E. ARONICA u. J. A. GORTER (2009):
Effects of SC58236, a selective COX-2 inhibitor, on epileptogenesis and spontaneous seizures in a rat model for temporal lobe epilepsy.
Epilepsy Res 84, 56-66
- HONCHAR, M. P., J. W. OLNEY u. W. R. SHERMAN (1983):
Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats.
Science 220, 323-325
- HUNT, S. J., J. I. MORROW u. J. J. CRAIG (2007):
Are we failing those with 'The Falling Sickness'? Time to modernise the approach to epilepsy care.
The Ulster medical journal 76, 3-5
- IRWIN, S. (1968):
Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse.
Psychopharmacologia 13, 222-257
- ISHII, T. M., C. SILVIA, B. HIRSCHBERG, C. T. BOND, J. P. ADELMAN u. J. MAYLIE (1997):
A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel.
Proceedings of the National Academy of Sciences 94, 11651-11656
- JACOBY, A. (1992):
Epilepsy and the quality of everyday life. Findings from a study of people with well-controlled epilepsy.
Soc Sci Med 34, 657-666
- JAKUBS, K., S. BONDE, R. E. IOSIF, C. T. EKDAHL, Z. KOKAIA, M. KOKAIA u. O. LINDVALL (2008):
Inflammation regulates functional integration of neurons born in adult brain.

J Neurosci 28, 12477-12488

JOINER, W. J., L. Y. WANG, M. D. TANG u. L. K. KACZMAREK (1997):
hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels.
Proc Natl Acad Sci U S A 94, 11013-11018

JONES, L. L., R. B. BANATI, M. B. GRAEBER, L. BONFANTI, G. RAIVICH u. G. W. KREUTZBERG (1997):
Population control of microglia: does apoptosis play a role?
J Neurocytol 26, 755-770

JUNG, K. H., K. CHU, S. T. LEE, J. KIM, D. I. SINN, J. M. KIM, D. K. PARK, J. J. LEE, S. U. KIM, M. KIM, S. K. LEE u. J. K. ROH (2006):
Cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, inhibits the altered hippocampal neurogenesis with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus.
Neurobiology of disease 23, 237-246

KANNER, A. M. (2004):
Recognition of the various expressions of anxiety, psychosis, and aggression in epilepsy.
Epilepsia 45 Suppl 2, 22-27

KAUSHAL, V., P. D. KOEBERLE, Y. WANG u. L. C. SCHLICHTER (2007):
The Ca²⁺-activated K⁺ channel KCNN4/KCa3.1 contributes to microglia activation and nitric oxide-dependent neurodegeneration.
J Neurosci 27, 234-244

KEMPERMANN, G., D. GAST, G. KRONENBERG, M. YAMAGUCHI u. F. H. GAGE (2003):
Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice.
Development 130, 391-399

KEMPERMANN, G., H. G. KUHN, J. WINKLER u. F. H. GAGE (1998):
[New nerve cells for the adult brain. Adult neurogenesis and stem cell concepts in neurologic research].
Der Nervenarzt 69, 851-857

KETTENMANN, H., U. K. HANISCH, M. NODA u. A. VERKHRATSKY (2011):
Physiology of microglia.
Physiol Rev 91, 461-553

KEUKER, J. I., G. K. VOLLMANN-HONSDORF u. E. FUCHS (2001):
How to use the optical fractionator: an example based on the estimation of neurons in the hippocampal CA1 and CA3 regions of tree shrews.
Brain research. Brain research protocols 7, 211-221

KHANNA, R., L. ROY, X. ZHU u. L. C. SCHLICHTER (2001):
K⁺ channels and the microglial respiratory burst.
American journal of physiology. Cell physiology 280, C796-806

KIGERL, K. A., J. C. GENSEL, D. P. ANKENY, J. K. ALEXANDER, D. J. DONNELLY u. P. G. POPOVICH (2009):

Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord.

J Neurosci 29, 13435-13444

KIM, S. U. u. J. DE VELLIS (2005):

Microglia in health and disease.

Journal of neuroscience research 81, 302-313

KLUGER, E. K., R. MALIK u. M. GOVENDIR (2009):

Veterinarians' preferences for anticonvulsant drugs for treating seizure disorders in dogs and cats.

Aust Vet J 87, 445-449

KOHLER, R., H. WULFF, I. EICHLER, M. KNEIFEL, D. NEUMANN, A. KNORR, I. GRGIC, D. KAMPFE, H. SI, J. WIBAWA, R. REAL, K. BORNER, S. BRAKEMEIER, H. D. ORZECOWSKI, H. P. REUSCH, M. PAUL, K. G. CHANDY u. J. HOYER (2003):

Blockade of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis.

Circulation 108, 1119-1125

KOKAIA, M. (2011):

Seizure-induced neurogenesis in the adult brain.

The European journal of neuroscience 33, 1133-1138

KONESKI, J. A. u. E. B. CASELLA (2010):

Attention deficit and hyperactivity disorder in people with epilepsy: diagnosis and implications to the treatment.

Arquivos de neuro-psiquiatria 68, 107-114

KREUTZBERG, G. W. (1996):

Microglia: a sensor for pathological events in the CNS.

Trends Neurosci 19, 312-318

KWAN, P., A. ARZIMANOGLU, A. T. BERG, M. J. BRODIE, W. ALLEN HAUSER, G. MATHERN, S. L. MOSHÉ, E. PERUCCA, S. WIEBE u. J. FRENCH (2010):

Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies.

Epilepsia 51, 1069-1077

KWAN, P. u. M. J. BRODIE (2000):

Early identification of refractory epilepsy.

N Engl J Med 342, 314-319

KWAN, P. u. M. J. BRODIE (2006):

Refractory epilepsy: mechanisms and solutions.

Expert Rev Neurother 6, 397-406

KWON, C., M. LIU, H. QUAN, V. THOO, S. WIEBE u. N. JETTE (2011):
Motor vehicle accidents, suicides, and assaults in epilepsy: a population-based study.
Neurology 76, 801-806

LEHMANN, K., M. BUTZ u. G. TEUCHERT-NOODT (2005):
Offer and demand: proliferation and survival of neurons in the dentate gyrus.
The European journal of neuroscience 21, 3205-3216

LHATOO, S. D. u. J. W. SANDER (2005):
Cause-specific mortality in epilepsy.
Epilepsia 46 Suppl 11, 36-39

LIU, B., K. WANG, H. M. GAO, B. MANDAVILLI, J. Y. WANG u. J. S. HONG (2001):
Molecular consequences of activated microglia in the brain: overactivation induces apoptosis.
J Neurochem 77, 182-189

LOGSDON, N. J., J. KANG, J. A. TOGO, E. P. CHRISTIAN u. J. AIYAR (1997):
A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes.
The Journal of biological chemistry 272, 32723-32726

LOSCHER, W. (1997):
Animal models of intractable epilepsy.
Prog Neurobiol 53, 239-258

LOSCHER, W. (2002):
Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy.
Epilepsy Res 50, 105-123

LOSCHER, W. (2012):
Strategies for antiepileptogenesis: Antiepileptic drugs versus novel approaches evaluated in post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy.
In: *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*
4th, Bethesda (MD), S.

LÖSCHER, W. (1997):
Animal models of intractable epilepsy.
Progress in neurobiology 53, 239-258

LOSCHER, W. u. D. SCHMIDT (2002):
New horizons in the development of antiepileptic drugs.
Epilepsy Res 50, 3-16

LOSCHER, W. u. D. SCHMIDT (2011):
Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma.
Epilepsia 52, 657-678

- MAEZAWA, I., D. P. JENKINS, B. E. JIN u. H. WULFF (2012):
Microglial KCa3.1 Channels as a Potential Therapeutic Target for Alzheimer's Disease.
International journal of Alzheimer's disease 2012, 868972
- MAEZAWA, I., P. I. ZIMIN, H. WULFF u. L. W. JIN (2011):
Amyloid-beta protein oligomer at low nanomolar concentrations activates microglia and induces microglial neurotoxicity.
The Journal of biological chemistry 286, 3693-3706
- MARCON, J., B. GAGLIARDI, S. BALOSSO, M. MAROSO, F. NOE, M. MORIN, M. LERNER-NATOLI, A. VEZZANI u. T. RAVIZZA (2009):
Age-dependent vascular changes induced by status epilepticus in rat forebrain: implications for epileptogenesis.
Neurobiology of disease 34, 121-132
- MARKAKIS, E. A. u. F. H. GAGE (1999):
Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles.
The Journal of comparative neurology 406, 449-460
- MAROSO, M., S. BALOSSO, T. RAVIZZA, V. IORI, C. I. WRIGHT, J. FRENCH u. A. VEZZANI (2011):
Interleukin-1beta biosynthesis inhibition reduces acute seizures and drug resistant chronic epileptic activity in mice.
Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics 8, 304-315
- MARTINOVE, M. (2010):
Epilepsy and dependence.
Neuropsychopharmacol Hung 12, 295-300
- MATHIEU, P., A. P. PIANTANIDA u. F. PITOSI (2010):
Chronic expression of transforming growth factor-beta enhances adult neurogenesis.
Neuroimmunomodulation 17, 200-201
- MAULER, F., V. HINZ, E. HORVATH, J. SCHUHMACHER, H. A. HOFMANN, S. WIRTZ, M. G. HAHN u. K. URBAHNS (2004):
Selective intermediate-/small-conductance calcium-activated potassium channel (KCNN4) blockers are potent and effective therapeutics in experimental brain oedema and traumatic brain injury caused by acute subdural haematoma.
The European journal of neuroscience 20, 1761-1768
- MCINTYRE, D. C. u. K. L. GILBY (2008):
Mapping seizure pathways in the temporal lobe.
Epilepsia 49, 23-30
- MCINTYRE, D. C. u. K. L. GILBY (2009):
Kindling as a model of human epilepsy.
The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques 36 Suppl 2, S33-35

MCINTYRE, D. C., M. O. POULTER u. K. GILBY (2002):

Kindling: some old and some new.

Epilepsy research 50, 79-92

MCNAMARA, J. O. (1984):

Kindling: an animal model of complex partial epilepsy.

Annals of neurology 16 Suppl, S72-76

MING, G. L. u. H. SONG (2011):

Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions.

Neuron 70, 687-702

MONJE, M. L., H. TODA u. T. D. PALMER (2003):

Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis.

Science 302, 1760-1765

MONTGOMERY, K. C. u. J. A. MONKMAN (1955):

The relation between fear and exploratory behavior.

Journal of comparative and physiological psychology 48, 132-136

MORRIS, R. (1984):

Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat.

Journal of neuroscience methods 11, 47-60

MORRIS, R. G., P. GARRUD, J. N. RAWLINS u. J. O'KEEFE (1982):

Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions.

Nature 297, 681-683

MOSSER, D. M. u. J. P. EDWARDS (2008):

Exploring the full spectrum of macrophage activation.

Nat Rev Immunol 8, 958-969

NAJJAR, S., M. BERNBAUM, G. LAI u. O. DEVINSKY (2008):

Immunology and epilepsy.

Reviews in neurological diseases 5, 109-116

NAJJAR, S., D. PEARLMAN, D. C. MILLER u. O. DEVINSKY (2011):

Refractory epilepsy associated with microglial activation.

The neurologist 17, 249-254

NEWELL, E. W., E. F. STANLEY u. L. C. SCHLICHTER (2007):

Reversed Na⁺/Ca²⁺ exchange contributes to Ca²⁺ influx and respiratory burst in microglia.

Channels (Austin) 1, 366-376

NIMMERJAHN, A., F. KIRCHHOFF u. F. HELMCHEN (2005):

Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo.

Science 308, 1314-1318

PARENT, J. M., R. C. ELLIOTT, S. J. PLEASURE, N. M. BARBARO u. D. H. LOWENSTEIN (2006):

Aberrant seizure-induced neurogenesis in experimental temporal lobe epilepsy.
Annals of neurology 59, 81-91

PARENT, J. M. u. D. H. LOWENSTEIN (2002):

Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain?
Progress in brain research 135, 121-131

PARENT, J. M. u. G. G. MURPHY (2008):

Mechanisms and functional significance of aberrant seizure-induced hippocampal neurogenesis.
Epilepsia 49 Suppl 5, 19-25

PARISI, P., R. MOAVERO, A. VERROTTI u. P. CURATOLO (2010):

Attention deficit hyperactivity disorder in children with epilepsy.
Brain Dev 32, 10-16

PAULI, E. u. H. STEFAN (2009a):

[Emotional and affective disorders in epilepsy].
Der Nervenarzt 80, 729-744

PAULI, E. u. H. STEFAN (2009b):

[Emotional and affective disorders, anxiety and personality disorders in epilepsies].
Der Nervenarzt 80, 1440-1451

PAXINOS, G. u. C. WATSON (2005):

The rat brain in stereotactic coordinates.
Academic Press, Sydney

PEKCEC, A. u. H. POTSCHKA (2007):

Newborn neurons with hilar basal dendrites hallmark epileptogenic networks.
Neuroreport 18, 585-589

PEKCEC, A., B. UNKRÜER, J. SCHLICHTIGER, J. SOERENSEN, A. M. HARTZ, B. BAUER, E. A. VAN VLIET, J. A. GORTER u. H. POTSCHKA (2009):

Targeting prostaglandin E2 EP1 receptors prevents seizure-associated P-glycoprotein up-regulation.
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 330, 939-947

PELLOW, S., P. CHOPIN, S. E. FILE u. M. BRILEY (1985):

Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat.
Journal of neuroscience methods 14, 149-167

PINEL, J. P. u. L. I. ROVNER (1978):

Electrode placement and kindling-induced experimental epilepsy.
Exp Neurol 58, 335-346

PINHEIRO, S. H., H. ZANGROSSI, JR., C. M. DEL-BEN u. F. G. GRAEFF (2007):

Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents.

Anais da Academia Brasileira de Ciencias 79, 71-85

PITKANEN, A., I. KHARATISHVILI, S. NARKILAHTI, K. LUKASIUK u. J. NISSINEN (2005):

Administration of diazepam during status epilepticus reduces development and severity of epilepsy in rat.

Epilepsy Res 63, 27-42

PITKANEN, A. u. K. LUKASIUK (2009):

Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy.

Epilepsy Behav 14 Suppl 1, 16-25

PITKANEN, A. u. K. LUKASIUK (2011):

Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets.

Lancet neurology 10, 173-186

PITKÄNEN, A. u. T. P. SUTULA (2002):

Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy.

The Lancet Neurology 1, 173-181

PODELL, M., W. R. FENNER u. J. D. POWERS (1995):

Seizure classification in dogs from a nonreferral-based population.

J Am Vet Med Assoc 206, 1721-1728

POLASCHECK, N., M. BANKSTAHL u. W. LOSCHER (2010):

The COX-2 inhibitor parecoxib is neuroprotective but not antiepileptogenic in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy.

Exp Neurol 224, 219-233

POLAZZI, E. u. A. CONTESTABILE (2006):

Overactivation of LPS-stimulated microglial cells by co-cultured neurons or neuron-conditioned medium.

J Neuroimmunol 172, 104-111

POLAZZI, E. u. B. MONTI (2010):

Microglia and neuroprotection: from in vitro studies to therapeutic applications.

Prog Neurobiol 92, 293-315

POTSCHKA, H., E. FRIDERICHS u. W. LOSCHER (2000):

Anticonvulsant and proconvulsant effects of tramadol, its enantiomers and its M1 metabolite in the rat kindling model of epilepsy.

British journal of pharmacology 131, 203-212

PRUT, L. u. C. BELZUNG (2003):

The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review.

European journal of pharmacology 463, 3-33

RACINE, R. J. (1972):

Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure.

Electroencephalography and clinical neurophysiology 32, 281-294

RAMOS, A. (2008):
Animal models of anxiety: do I need multiple tests?
Trends Pharmacol Sci 29, 493-498

RAVIZZA, T., S. BALOSSO u. A. VEZZANI (2011):
Inflammation and prevention of epileptogenesis.
Neurosci Lett 497, 223-230

RAVIZZA, T., K. BOER, S. REDEKER, W. G. SPLIET, P. C. VAN RIJEN, D. TROOST, A. VEZZANI u. E. ARONICA (2006):
The IL-1beta system in epilepsy-associated malformations of cortical development.
Neurobiology of disease 24, 128-143

RAVIZZA, T., B. GAGLIARDI, F. NOE, K. BOER, E. ARONICA u. A. VEZZANI (2008):
Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy.
Neurobiology of disease 29, 142-160

REICH, E. P., L. CUI, L. YANG, C. PUGLIESE-SIVO, A. GOLOVKO, M. PETRO, G. VASSILEVA, I. CHU, A. A. NOMEIR, L. K. ZHANG, X. LIANG, J. A. KOZLOWSKI, S. K. NARULA, P. J. ZAVODNY u. C. C. CHOU (2005):
Blocking ion channel KCNN4 alleviates the symptoms of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice.
European journal of immunology 35, 1027-1036

REZAIE, P., A. DEAN, D. MALE u. N. ULFIG (2005):
Microglia in the cerebral wall of the human telencephalon at second trimester.
Cereb Cortex 15, 938-949

REZAIE, P. u. D. MALE (2002):
Mesoglia & microglia--a historical review of the concept of mononuclear phagocytes within the central nervous system.
Journal of the history of the neurosciences 11, 325-374

RIAZI, K., M. A. GALIC u. Q. J. PITTMAN (2010):
Contributions of peripheral inflammation to seizure susceptibility: cytokines and brain excitability.
Epilepsy Res 89, 34-42

ROCHA, L. L., M. L. LOPEZ-MERAZ, J. NIQUET u. C. G. WASTERLAIN (2007):
Do single seizures cause neuronal death in the human hippocampus?
Epilepsy currents / American Epilepsy Society 7, 77-81

RODGERS, R. J. u. A. DALVI (1997):
Anxiety, defence and the elevated plus-maze.
Neuroscience and biobehavioral reviews 21, 801-810

SALUM, C., S. MORATO u. A. C. ROQUE-DA-SILVA (2000):

Anxiety-like behavior in rats: a computational model.

Neural networks : the official journal of the International Neural Network Society 13, 21-29

SANCHEZ, C. (1997):

Acute stress enhances anxiolytic-like drug responses of mice tested in a black and white test box.

European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology 7, 283-288

SANTOS, N. F., R. H. MARQUES, L. CORREIA, R. SINIGAGLIA-COIMBRA, L. CALDERAZZO, E. R. SANABRIA u. E. A. CAVALHEIRO (2000):

Multiple pilocarpine-induced status epilepticus in developing rats: a long-term behavioral and electrophysiological study.

Epilepsia 41 Suppl 6, S57-63

SATO, M., R. J. RACINE u. D. C. MCINTYRE (1990):

Kindling: basic mechanisms and clinical validity.

Electroencephalography and clinical neurophysiology 76, 459-472

SCHARFMAN, H. E. u. D. P. MCCLOSKEY (2009):

Postnatal neurogenesis as a therapeutic target in temporal lobe epilepsy.

Epilepsy Res 85, 150-161

SCHARFMAN, H. E., A. E. SOLLAS, R. E. BERGER, J. H. GOODMAN u. J. P. PIERCE (2003):

Perforant path activation of ectopic granule cells that are born after pilocarpine-induced seizures.

Neuroscience 121, 1017-1029

SCHILLING, T., C. STOCK, A. SCHWAB u. C. EDER (2004):

Functional importance of Ca²⁺-activated K⁺ channels for lysophosphatidic acid-induced microglial migration.

The European journal of neuroscience 19, 1469-1474

SEEGER, N., C. ZELLINGER, A. RODE, F. ROLOFF, G. BICKER, V. RUSSMANN, S. FISCHBORN, H. WENDT u. H. POTSCHKA (2011):

The erythropoietin-derived peptide mimetic pHBSP affects cellular and cognitive consequences in a rat post-status epilepticus model.

Epilepsia 52, 2333-2343

SHARMA, S., S. RAKOCZY u. H. BROWN-BORG (2010):

Assessment of spatial memory in mice.

Life sciences 87, 521-536

SHIHAB, N., J. BOWEN u. H. A. VOLK (2011):

Behavioral changes in dogs associated with the development of idiopathic epilepsy.

Epilepsy Behav 21, 160-167

SHIMADA, T., K. MATSUMOTO, M. OSANAI, H. MATSUDA, K. TERASAWA u. H. WATANABE (1995):

The modified light/dark transition test in mice: evaluation of classic and putative anxiolytic and anxiogenic drugs.

General pharmacology 26, 205-210

SHORS, T. J., G. MIESEGAES, A. BEYLIN, M. ZHAO, T. RYDEL u. E. GOULD (2001):

Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories.

Nature 410, 372-376

SIERRA, A., J. M. ENCINAS, J. J. DEUDERO, J. H. CHANCEY, G. ENIKOLOPOV, L. S. OVERSTREET-WADICHE, S. E. TSIRKA u. M. MALETIC-SAVATIC (2010):

Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis.

Cell stem cell 7, 483-495

SITCOSKE O'SHEA, M., J. B. ROSEN, R. M. POST u. S. R. WEISS (2000):

Specific amygdaloid nuclei are involved in suppression or propagation of epileptiform activity during transition stage between oral automatisms and generalized clonic seizures.

Brain research 873, 1-17

SLOVITER, R. S. (1999):

Status epilepticus-induced neuronal injury and network reorganization.

Epilepsia 40 Suppl 1, S34-39; discussion S40-31

SLOVITER, R. S. (2005):

The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge.

Comptes rendus biologies 328, 143-153

SMITH BAILEY, K. u. C. W. DEWEY (2009):

The seizing cat. Diagnostic work-up and therapy.

J Feline Med Surg 11, 385-394

SODERLUND, H., M. MOSCOVITCH, N. KUMAR, M. MANDIC u. B. LEVINE (2012):

As time goes by: hippocampal connectivity changes with remoteness of autobiographical memory retrieval.

Hippocampus 22, 670-679

STAFSTROM, C. (2006):

Behavioral and cognitive testing procedures in animal models of epilepsy.

Pitkä nen A, Schwartzkroin PA, and Moshé SL (eds.) Models of Seizures and Epilepsy 613-628

STEFAN, H. u. E. PAULI (2008):

[Cognition and epilepsies].

Der Nervenarzt 79 Suppl 2, 77-91; quiz 92

STERIO, D. C. (1984):

The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector.

Journal of microscopy 134, 127-136

SUGAMA, S., T. TAKENOUCI, M. FUJITA, B. CONTI u. M. HASHIMOTO (2009):
Differential microglial activation between acute stress and lipopolysaccharide treatment.

J Neuroimmunol 207, 24-31

SURGES, R. u. J. W. SANDER (2012):

Sudden unexpected death in epilepsy: mechanisms, prevalence, and prevention.

Current opinion in neurology 25, 201-207

SURGES, R., R. D. THIJS, H. L. TAN u. J. W. SANDER (2009):

Sudden unexpected death in epilepsy: risk factors and potential pathomechanisms.

Nature reviews. Neurology 5, 492-504

SUTHERLAND, R. J., B. KOLB u. I. Q. WHISHAW (1982):

Spatial mapping: definitive disruption by hippocampal or medial frontal cortical damage in the rat.

Neurosci Lett 31, 271-276

TAOUFIK, E. u. L. PROBERT (2008):

Ischemic neuronal damage.

Current pharmaceutical design 14, 3565-3573

TEMKIN, O. (1933):

The doctrine of epilepsy in the Hippocratic writings.

Bull Hist Med 19, 277-222

THOMAS, W. B. (2010):

Idiopathic epilepsy in dogs and cats.

Vet Clin North Am Small Anim Pract 40, 161-179

THORED, P., U. HELDMANN, W. GOMES-LEAL, R. GISLER, V. DARSALIA, J. TANEERA, J. M. NYGREN, S. E. JACOBSEN, C. T. EKDAHL, Z. KOKAIA u. O. LINDVALL (2009):

Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke.

Glia 57, 835-849

TOMSON, T. (2000):

Mortality in epilepsy.

Journal of neurology 247, 15-21

TOMSON, T., E. BEGHI, A. SUNDQVIST u. S. I. JOHANNESSEN (2004):

Medical risks in epilepsy: a review with focus on physical injuries, mortality, traffic accidents and their prevention.

Epilepsy Res 60, 1-16

TOMSON, T., T. WALCZAK, M. SILLANPAA u. J. W. SANDER (2005):

Sudden unexpected death in epilepsy: a review of incidence and risk factors.

Epilepsia 46 Suppl 11, 54-61

TOYAMA, K., H. WULFF, K. G. CHANDY, P. AZAM, G. RAMAN, T. SAITO, Y. FUJIWARA, D. L. MATTSON, S. DAS, J. E. MELVIN, P. F. PRATT, O. A. HATOUM, D. D. GUTTERMAN, D. R. HARDER u. H. MIURA (2008):

The intermediate-conductance calcium-activated potassium channel KCa3.1 contributes to atherogenesis in mice and humans.

The Journal of clinical investigation 118, 3025-3037

TURRIN, N. P. u. S. RIVEST (2004):

Innate immune reaction in response to seizures: implications for the neuropathology associated with epilepsy.

Neurobiology of disease 16, 321-334

TURRIN, N. P. u. S. RIVEST (2006):

Molecular and cellular immune mediators of neuroprotection.

Mol Neurobiol 34, 221-242

VALLIERES, L., I. L. CAMPBELL, F. H. GAGE u. P. E. SAWCHENKO (2002):

Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6.

J Neurosci 22, 486-492

VAN PRAAG, H., A. F. SCHINDER, B. R. CHRISTIE, N. TONI, T. D. PALMER u. F. H. GAGE (2002):

Functional neurogenesis in the adult hippocampus.

Nature 415, 1030-1034

VEZZANI, A. u. T. Z. BARAM (2007):

New roles for interleukin-1 Beta in the mechanisms of epilepsy.

Epilepsy currents / American Epilepsy Society 7, 45-50

VEZZANI, A., J. FRENCH, T. BARTFAI u. T. Z. BARAM (2011):

The role of inflammation in epilepsy.

Nature reviews. Neurology 7, 31-40

VEZZANI, A., A. FRIEDMAN u. R. J. DINGLELINE (2013):

The role of inflammation in epileptogenesis.

Neuropharmacology 69, 16-24

VEZZANI, A. u. T. GRANATA (2005):

Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence.

Epilepsia 46, 1724-1743

VEZZANI, A., D. MONETA, M. CONTI, C. RICHICHI, T. RAVIZZA, A. DE LUIGI, M. G. DE SIMONI, G. SPERK, S. ANDELL-JONSSON, J. LUNDKVIST, K. IVERFELDT u. T. BARTFAI (2000):

Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice.

Proc Natl Acad Sci U S A 97, 11534-11539

VITRY, S., J. Y. BERTRAND, A. CUMANO u. M. DUBOIS-DALCQ (2003):

Primordial hematopoietic stem cells generate microglia but not myelin-forming cells in a neural environment.

J Neurosci 23, 10724-10731

VON CAMPE, G., D. D. SPENCER u. N. C. DE LANEROLLE (1997):

Morphology of dentate granule cells in the human epileptogenic hippocampus.

Hippocampus 7, 472-488

VOUTSINOS-PORCHE, B., E. KONING, H. KAPLAN, A. FERRANDON, M. GUENOUNOU, A. NEHLIG u. J. MOTTE (2004):

Temporal patterns of the cerebral inflammatory response in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy.

Neurobiology of disease 17, 385-402

WALSH, R. N. u. R. A. CUMMINS (1976):

The Open-Field Test: a critical review.

Psychological bulletin 83, 482-504

WALTER, L. u. H. NEUMANN (2009):

Role of microglia in neuronal degeneration and regeneration.

Semin Immunopathol 31, 513-525

WEST, M. J., L. SLOMIANKA u. H. J. GUNDERSEN (1991):

Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator.

The Anatomical record 231, 482-497

WILSON, J. V. u. E. H. REYNOLDS (1990):

Texts and documents. Translation and analysis of a cuneiform text forming part of a Babylonian treatise on epilepsy.

Medical history 34, 185-198

WULFF, H. u. N. A. CASTLE (2010):

Therapeutic potential of KCa3.1 blockers: recent advances and promising trends.

Expert review of clinical pharmacology 3, 385-396

WULFF, H., G. A. GUTMAN, M. D. CAHALAN u. K. G. CHANDY (2001):

Delineation of the clotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel, IKCa1.

The Journal of biological chemistry 276, 32040-32045

WULFF, H., M. J. MILLER, W. HANSEL, S. GRISSMER, M. D. CAHALAN u. K. G. CHANDY (2000):

Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, IKCa1: a potential immunosuppressant.

Proc Natl Acad Sci U S A 97, 8151-8156

ZHOU, J. L., Q. ZHAO u. G. L. HOLMES (2007):

Effect of levetiracetam on visual-spatial memory following status epilepticus.

Epilepsy Res 73, 65-74

ZIMMERMANN, R., V. HULSMAYER, C. SAUTER-LOUIS u. A. FISCHER (2009a):
Status epilepticus and epileptic seizures in dogs.
J Vet Intern Med 23, 970-976

ZIMMERMANN, R., V. I. HULSMAYER, C. SAUTER-LOUIS u. A. FISCHER (2009b):
Status epilepticus and epileptic seizures in dogs.
J Vet Intern Med 23, 970-976

ZOLKOWSKA, D., C. N. BANKS, A. DHIR, B. INCEOGLU, J. R. SANBORN, M. R.
MCCOY, D. A. BRUUN, B. D. HAMMOCK, P. J. LEIN u. M. A. ROGAWSKI (2012):
Characterization of seizures induced by acute and repeated exposure to
tetramethylenedisulfotetramine.
The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 341, 435-446

X. ANHANG

1. Geräte

Geräte und Software zur Implantation der Ableitungs- und Stimulationselektrode, zur Stimulation der BLA und zur Video- und EEG-Überwachung

Geräte/Software	Hersteller
Beobachtungskäfige	Domes Aquaristik, München
Dentalbohrer	Fa. Karl Fischer, Pforzheim
EEG-Ableitung (PowerLab 8/30 und 4/30, Animal BioAmp)	ADInstruments Ltd., Hastings, UK
EEG-Software (Chart5 für Windows)	ADInstruments Ltd., Hastings, UK
Personal Computer	Diverse Bezugsquellen
Stereotaktischer Apparat	TSE Systems GmbH, Bad Homburg
Stimulations- und EEG-Ableitungskabel	Conrad Elektronik, München
Stimulatoreinheit SE (Battery charger, Accupulser A310C, Stimulus Isolator A365)	World Precision Instruments, Berlin
Stimulatoreinheit Kindling (Typ 215E)	Fa. Sachs Elektronik, Hugstetten
Videokameras (CCD-schwarz/weiß Kamera, GCD-Farbkamera)	Conrad Elektronik, München

Geräte für Verhaltensuntersuchungen

Geräte/Software	Bezugsquelle
Videokamera (CCTV-schwarz/weiß Kamera)	Panasonic, Suzhou, China
Verhaltenssoftware (EthoVision XT 8.5)	Noldus Ethovision, Niederlande
Personalcomputer (Dell Precision Computer, T3400)	Dell, USA
Luxmeter (Light meter, MS 1300, Voltcraft®)	Conrad Electronic SE, Hirschau

Sonstige Geräte und Software

Geräte/Software	Bezugsquelle
HPLC (Smartline: Manager 5000, Pump 1000, UV Detector 2600)	Knauer, Berlin
Konfokales Mikroskop (Zeiss LSM 510) mit digitaler Kamera (Zeiss AxioCam MRc)	Carl Zeiss, Göttingen Hitachi Denshi, Japan
Lichtmikroskop (Olympus BH-2) mit digitaler Kamera (Zeiss AxioCam MRc)	Olympus, Japan Carl Zeiss, Göttingen
Mikrotom (Frigomobil 1205)	Reichert-Jung Leica, Microsystems GmbH, Nusslos
Reagenzglasschüttler (Mixer Uzusio, Modell VTX-3000L)	LMS [®] , Tokyo, Japan
Stereologische Software (Stereoinvestigator 6.0)	Microbrightfield Europe, Magdeburg
Stereologisches Mikroskop (Leica DMLB) mit Plan-Neofluar Linse und digitaler Farbkamera (single-chip charge coupled device, CCD, CX9000) und einem AMD Athlon TM 64er Rechenprozessor	Leica, Bensheim Microbrightfield Europe, Magdeburg AMD, Sunnyvale, CA, USA
Tierkäfige	EHRET GmbH & Co. KG, Emmendingen
Zentrifuge (Centrifuge 5804R)	Eppendorf, Hamburg

2. Lösungen und Substanzen

Lösungen

Blocking-Lösung

- in *Carrier*-Lösung
- 11% Normalserum (Esel, Kaninchen, Ziege)
- 2% Rinderserumalbumin

Carrier-Lösung

- in TBS
- 1% Normalserum (Esel, Kaninchen, Ziege)
- 1% Rinderserumalbumin
- 0,3% Triton X

Chrom-Gelatine-Lösung

- 0,7 g Gelatine + 0,07 g Chrom III
- mit 100 ml Aqua dest. vermischen
- langsam auf 60°C erhitzen, bis sich die Gelatine gelöst hat
- langsam abkühlen lassen
- eine Messerspitze Thymol dazu geben

DAB-Lösung

- 1 mg 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid in 100 ml Aqua dest. lösen
- 4 ml Tris/Ni-Lösung
- 1 µl 30%iges H₂O₂ frisch hinzufügen

Formamid/SSC

- 4 x SSC: 20 x SSC 1:5 verd. + 0,06 M Natrium-Citrat-Dihydrat
- 2 ml 100% Formamid + 2 ml 4 x SSC

Gefriermedium

- 4,28 g Glukose
- 0,07 MgCl-Hexahydrat in 25 ml 0,1 M PBS lösen
- ad 50 ml Glycerin

0,05 M Tris gepufferte Saline (TBS)

- 0,9% NaCl
- 0,05 M Tris[hydroxymethyl]-aminomethan
- mit 32%iger HCl auf pH 7,6 einstellen

Natrium-Citrat-Puffer

- 2,94 g Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat auf 1000 ml Aqua dest.
- einstellen auf pH 9,0 mit NaOH

4% Paraformaldehyd

- 8% PFA in Aqua dest. auf 60-70°C erhitzen und abkühlen lassen
- mit 6 M NaOH klären und anschließend filtrieren
- mit 0,2 M Phosphatpuffer auf 4%ige Lösung verdünnen

0,01 M Phosphatgepufferte 0,9%ige Kochsalzlösung

- 0,9% NaCl
- 0,01 M Phosphatpuffer

0,4 M Phosphatpuffer (Stammlösung)

- 45,43 g/l Na_2HPO_4 (wasserfrei)
- 12,48 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
- in Aqua dest. und mit 1 M NaOH auf pH 7,4 einstellen

SSC-Stammlösung x 20

- 3 M NaCl (175,32 g/l) + 0,3 M Natrium-Citrat-Dihydrat (88,23 g/l)

Thionin (Färbelösung)

- 100 ml 1 M Essigsäure + 36 ml 1 M NaOH
- auf 1 L mit Aqua dest. auffüllen und auf 60-70°C erhitzen
- 1,25 g Thionin darin lösen
- 1 h auf dem Magnetrührer rühren und anschließend heiß filtrieren

Thionin-Färbung

- jeweils 3 min in 100%, 95%, 70% und 50% Alkohol und Aqua dest.

- 20 sec. in Thionin
- jeweils 3 min in 50%, 70%, 95% und 100% Alkohol
- 3 min in Terpeneol/Rotisol 1:1
- 2 x 3 min in Rotisol
- mit Entellan eindecken

Tris-Nickel-Lösung

- in 0,05 M TBS
- 0,6% Ammonium-Nickelsulfat
- mit 2 M NaOH auf pH 7,6 einstellen

30%ige Zuckerlösung

- 6 g Zucker
- ad 20 g 0,1 M Phosphatpuffer

Substanzen

Substanz	Bezugsquelle
Ammonium-Nickelsulfat-Hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bepanthen [®] Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital, Leverkusen
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bromdesoxyuridin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bupivacain (Jenapharm [®])	Mibe GmbH, Brehna
Chloralhydrat	E. Merck AG, Darmstadt
Chrom-Kaliumsulfat-Dodecahydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Cy2-konjugiertes Streptavidin	Jackson Immuno Research, Westgrove, USA
Cy3-konjugierter Esel-anti-Ratte Antikörper	Jackson Immuno Research, Westgrove, USA
3,3'-Diaminobenzidin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Diazepam (Diazepam-ratiopharm [®])	Ratiopharm GmbH, Ulm
Einbettungsmedium (Tissue Tec)	Leica Microsystems GmbH, Nussloch

Eindeckmedium (Entellan)	Fa. Merck AG, Darmstadt
Essigsäure 99,8%	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethacridinlactat-Monohydrat (Rivanol [®])	Dermapharm AG, Grünwald
Ethanol 99,8%	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Formaldehyd	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Formamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Gelatine, gepulvert	E. Merck AG, Darmstadt
Gentamicinsulfat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Kaltpolymerisierender Kunststoff (Paladur [®])	Heraeus Kulzer, Hanau
Marbofloxacin (Marbocyl [®])	Vétoquinol, Ravensburg
Meloxicam (Metacam [®])	Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein
Miglyol 812 (Triglyceride, mittelkettige)	FAGRON, Barsbüttel
monoklonaler Maus-anti-NeuN-Antikörper	Merck Millipore, Billerica, USA
monoklonaler Maus-anti-Cd68-Antikörper	AbD Serotec, Kidlington, UK
monoklonaler Ratte-anti-BrdU-Antikörper	AbD Serotec, Kidlington, UK
Natriumchlorid-Lösung (isoton)	B. Braun Vet Care GmbH, Tuttlingen
Natrium-Citrat-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natronlauge	E. Merck AG, Darmstadt
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Pentobarbital-Natrium (Narcoren [®])	MERIAL GmbH, Hallbergmoos
polyklonaler biotinylierter Esel-anti-Maus- Antikörper	Jackson Immuno Research, Westgrove, USA
polyklonaler biotinylierter Kaninchen-anti-Maus-Antikörper	Dako, Glostrup, Dänemark
polyklonaler biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper	Jackson Immuno Research, Westgrove, USA
polyklonaler Kaninchen-anti-TNF alpha- Antikörper	Abcam, Cambridge, UK
Phenobarbital sodium salt	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Serum (Kaninchen, Ziege)	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA

Serum (Esel)	Jackson Immuno Research, Westgrove, USA
Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase	Jackson Immuno Research, Westgrove, USA
Terpineol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Thionin (Acetate Salt)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Toluol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Triarylmethan-34	Arbeitsgruppe Wulff, University of California, Davis, USA
Tris[hydroxymethyl]-aminomethan	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Triton X-100	Applichem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Applichem, Darmstadt
Xylol-Ersatzmedium (Rotinol®)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

3. Beurteilung der Tiere nach dem modifizierten Irwin-Scale

1. Körperhaltung (in Ruhelage)

- 0 flach, auf der Seite oder auf dem Bauch liegend, kein Muskeltonus
- 1 teilweise erhaltener Muskeltonus, gelegentlich Haltungskorrekturen
- 2 normale Körperhaltung
- 3 starre oder verkrampfte Haltung (z.B. Opisthotonus)
- 4 Tiere zeigen keine Ruhelage, daher nicht bewertbar

2. Hautdurchblutung

- 0 Schwanz und Pfoten bläulich verfärbt: Zyanose
- 1 fast weiße Ohrmuscheln, Pfoten oder Schwänze mit kaum sichtbaren Gefäßen
- 2 normale Hautdurchblutung
- 3 Pfoten dunkelrosa, Schwanz kräftig hellrosa
- 4 Pfoten, Ohrmuscheln oder Schwanz rot

3. Atmung

- 0 Schnappatmung, akute Atemnot
- 1 verminderte, unregelmäßige, angestrenzte Atmung
- 2 normale Atmung
- 3 erhöhte Atemfrequenz
- 4 wie 3, jedoch auch in Ruhepausen

4. Vokalisation

- 3 zeitweise spontan auftretendes leises Piepsen
- 4 häufiger spontan auftretendes stärkeres Piepsen

5. Ptoxis (Lidspaltenweite)

- 0 Augenlider geschlossen
- 1 Augenlider $\frac{1}{2}$ geöffnet
- 2 Augenlider normal geöffnet

6. Exophthalmus

- 3 leichter Exophthalmus
- 4 ausgeprägter Exophthalmus

7. Piloerektion

- 4 vorhanden

8. Schwanztonus

- 0 Nachschleifen des Schwanzes beim Laufen
- 2 normale Schwanzhaltung
- 3 aufgestellter Schwanz (max. 90°-Winkel) während Ruhe- und Aktivitätsperiode, teilweise Schwanzschlagen
- 4 über den Körper aufgestellter Schwanz (Straub-Phänomen)

9. Lakrimation

- 4 vorhanden

10. Stereotypien

4 vorhanden

11. lokomotorische Aktivität (Ortsveränderung)

- 0 Ausfall
- 1 verminderte Bewegung, gelegentliches Putzen
- 2 normaler Bewegungsablauf
- 3 vermehrte, kräftige, eckige Bewegungen
- 4 ruheloser Bewegungstyp

12. Neugierverhalten (auf Vorzeigen eines Gegenstandes)

- 0 keine Reaktion
- 1 vermindertes Neugierverhalten
- 2 normal, Interesse am dargebotenen Gegenstand
- 3 ruckartiges Verfolgen, auch bei mehrmaligem Zurückziehen keine Adaptation
- 4 Angriffsverhalten

13. Berührungsreaktion (zunächst leichtes Streicheln über den Rücken, später eventuell

stärker)

- 0 Ausfall, auch stärkere Reize bleiben ohne Reaktion
- 1 nach mehrfachem oder verstärktem Reiz langsame, abgeschwächte Reaktion (Ducken, Entweichen)
- 2 normale Reaktion auf leichte Berührung
- 3 Ausweichen oder Ducken auf leichte Berührung
- 4 Flüchten über größere Distanz, Angriffsverhalten, Vokalisation auf leichte Berührung

14. Ataxie

- 3 Koordinierungsstörungen beim Laufen
- 4 Ausfall der Bewegungskoordination

15. Körpertemperatur

- 1 Temperatur um 2° C oder mehr gegenüber der Kontrolle vermindert
- 2 Temperatur normal
- 3 Temperatur um 2° C oder mehr gegenüber der Kontrolle erhöht

16. Reaktion auf Halten im Genick

- 0 völlig schlapp
- 1 geringer Tonus
- 2 normaler Muskeltonus
- 3 erhöhter Tonus
- 4 völlige Körperstarre

17. Bauchdeckenspannung (Druck gegen Bauchdecke)

- 1 verringerter Muskeltonus
- 2 normal
- 3 erhöhte Muskelspannung

18. Faeces

- 0 kein oder kaum Kot im Käfig

- 2 Kotbeschaffenheit und Menge normal
- 3 Kotmenge deutlich vermehrt
- 4 fast flüssiger Kot, Diarrhoe

Bei Abweichung in obengenannten Kriterien weiterführende Prüfung von:

19. Schreckhaftigkeit (auf Schnippen mit den Fingern)

- 0 Ausfall
- 1 abgeschwächte, verzögerte Schreckreaktion
- 2 normale Schreckreaktion
- 3 Flucht
- 4 starkes Zusammenzucken, Zukneifen der Augen, Anlegen der Ohren, Andrücken an Boden oder vorübergehende Erstarrung (Freezing)

20. Rektaltemperatur

- 1 Temperatur um 2° C mehr gegenüber der Kontrolle vermindert
- 2 Temperatur normal
- 3 Temperatur um 2° C oder mehr gegenüber der Kontrolle erhöht

XI. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen recht herzlich bedanken, die mich während dieser wichtigen und spannenden Zeit meiner akademischen Laufbahn begleitet haben.

Zu aller erst möchte ich meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Potschka danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Vielen herzlichen Dank für die Überlassung dieses interessanten Themas, die wissenschaftliche Anleitung bezüglich Planung und Durchführung der Experimente, sowie für die hilfreichen konstruktiven Anregungen während der gesamten Zeit. Weiterhin möchte ich mich für die fachliche sowie persönliche Förderung und ihr Engagement bezüglich meines beruflichen Werdeganges bedanken, welche für mich eine große Bereicherung waren. Das mir entgegengebrachte Vertrauen sowie die herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe werden mir noch lange in positiver Erinnerung bleiben.

Ein großer Dank geht an Vera Rußmann, die während meiner Zeit am Institut nicht nur meine Betreuerin, sondern auch eine gute Freundin geworden ist. Bei ihr möchte ich mich sowohl für die kompetente fachliche Betreuung bezüglich aller sich ergebenden Fragestellungen bedanken, als auch für die vielen Gespräche persönlicher Natur. Ihre lebensfrohe Art und ihr Lachen haben so manchen grauen Wintertag mit Sonnenschein gefüllt.

Sarah Fischborn danke ich für die anfängliche Betreuung des ersten Teils meiner Experimente. Ich konnte viel von ihr bezüglich des Kindlings lernen und danke hiermit recht herzlich für die kompetente fachliche Betreuung.

Ein besonderer, freundschaftlicher Dank gilt außerdem meinen Kolleginnen aus dem Doktorandenzimmer. Katharina Boes und Josephine Salvamoser waren während der gesamten Zeit der Erstellung dieser Dissertation eine große fachliche wie menschliche Stütze. Vielen Dank für eure tatkräftige fachliche Unterstützung sowie die schönen Restaurant-Besuche, Ausritte und die bereichernden Gespräche. Ihr habt ein Umfeld geschaffen, in dem es sehr leicht fällt, produktiv und enthusiastisch zu arbeiten und jeden Tag gerne zur Arbeit zu kommen. Kolleginnen wie euch gibt es kein zweites Mal.

Renée Bogdanovic danke ich für ihre Hilfe vor allem an den Wochenenden und zu später Stunde sowie die zahlreichen Diskussionen über immunhistochemische Färbungen. Weiterhin danke ich Luzie Rettenbeck und Andreas Walker, deren Anwesenheit die Atmosphäre im Doktorandenzimmer weiter beflügelt hat. Ich wünsche euch beiden viel Erfolg für eure Zeit am Institut und für euren weiteren beruflichen Werdegang. Lotta von Rüden danke ich für die sehr angenehme, kollegiale Atmosphäre und ihre fachliche wie persönliche Unterstützung in zahlreichen Situationen. Ihr alle habt mir eine wunderschöne Zeit bereitet, die ich dank euch nie vergessen werde und woran ich immer gerne zurückdenken werde.

Sabine Vican danke ich sehr herzlich für die kompetente und fürsorgliche Pflege meiner Versuchstiere.

Ein großer Dank gebührt auch Angela Vicidomini, Barbara Kohler, Marion Fisch, Regina Rentsch, Olga Cabezas, Claudia Siegl, Sieglinde Fischlein, Manfred Kutschka, Isabella Waclawczyk, Andreas Blaschke und Inge Sautter für die freundliche und kompetente technische Unterstützung.

Grazyna Langer möchte ich für ihren stetigen Einsatz bezüglich administrativer Fragestellungen danken.

Weiterhin möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen Eltern Erika und Klaus Ongerth für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht bedanken. Ein besonderer Dank gilt auch meiner Schwester Bettina Ongerth für die stets erfolgte moralische Unterstützung.

Florian Eckl gilt außerdem besonderer Dank für sein Verständnis, seine Unterstützung sowie die Rücksichtnahme während der gesamten Zeit der Anfertigung der Dissertation.

Das Stipendium PO 681/5-2 der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gewährte finanzielle Unterstützung dieser Dissertation.